

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANNE CAROLINE DEFRANCESCHI OLIVEIRA

SÍNTESE ENZIMÁTICA DO BODIESEL DE MICROALGAS A PARTIR DE
LIPASES PRODUZIDAS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS

Curitiba
2013

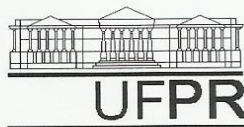
ANNE CAROLINE DEFRANCESCHI OLIVEIRA

SÍNTESE ENZIMÁTICA DO BIODIESEL DE MICROALGAS A PARTIR DE
LIPASES PRODUZIDAS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais - PIPE. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. André Bellin Mariano
Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Luiza Fernandes Rodrigues

Curitiba
2013



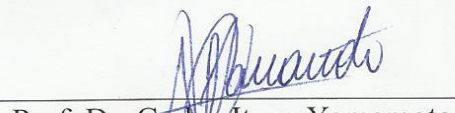
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais- PIPE
Setor de Tecnologia

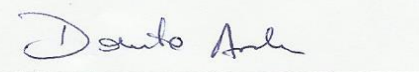
RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos vinte e sete dias do mês de agosto de 2013, na Sala de Reuniões do NPDEAS - no Centro Politécnico - UFPR, foi instalada Prof. Dr. Dante Homero Mosca Jr., coordenador do PIPE – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, a Banca Examinadora para a ducentésima quadragésima nona defesa de dissertação de mestrado na área de concentração: Engenharia e Ciência dos Materiais. Estiveram presentes no ato, além do coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes. A Banca Examinadora, atendendo a determinação do colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos Materiais, foi constituída pelos professores doutores: Prof. Dr. André Bellin Mariano (UFPR), Carlos Itsuo Yamamoto (UFPR), Donato A. G. Aranda (Unicentro). Às 14:00 horas, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **ANNE CAROLINE DEFRANCESCHI OLIVEIRA** a fazer a apresentação da dissertação de mestrado intitulada “**SÍNTESE ENZIMÁTICA DO BIODIESEL DE MICROALGAS A PARTIR DE LIPASES PRODUZIDAS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS.**” Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes. Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca decidiu pela Aprovação do candidato, (de acordo com a determinação dos artigos 68 e 69 da resolução 65/09 de 09.11.2009).

Curitiba, 27 de agosto de 2013.


Prof. Dr. André Bellin Mariano
Orientador


Prof. Dr. Carlos Itsuo Yamamoto
Examinador


Prof. Dr. Donato A. G. Aranda
Examinador

*Aos meus pais, que me forneceram o suporte
pra chegar até aqui.*

Dedico

O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas, é quem faz as verdadeiras perguntas.

(Claude Lévi-Strauss)

AGRADECIMENTOS

À minha co-orientadora Malú, por todos estes anos de trabalho juntas, pela amizade, companheirismo, e por sempre acreditar mais em mim, do que eu mesma.

Aos meus pais, por sempre estarem ao meu lado me apoiando e fazendo o possível e o impossível por mim.

Ao meu orientador André Mariano, por acreditar no meu potencial e pela disponibilidade em sempre me ajudar.

Aos meus amigos, por aguentarem meus surtos, me ajudarem na dissertação e em tudo mais, pelas traduções de artigos, e por serem uns lindos. Em especial á Cassi, Fe, Mah e Jacky.

À todos os técnicos de laboratório da Universidade Tuiuti do Paraná, especialmente à Cleusi, Ro e Luciano, que mesmo sem ter nenhuma obrigação sempre estiveram prontos a colaborar com o que fosse necessário.

Aos alunos de TCC e IC da Universidade Tuiuti do Paraná, que foram meus companheiros de trabalho durante estes anos, em especial ao Jean, que além de companheiro de trabalho, muitas vezes me ajudou, por pura camaradagem.

Ao Professor Tic do Departamento de Química da UFPR e ao seu aluno Gustavo, por realizarem todos os ensaios de cromatografia e RMN deste trabalho e por nos receberem com muita atenção em seu laboratório.

Aos meus dogs, Bob (*in memorian*) e Penélope. Especialmente a Pe, companheira eterna das madrugadas de trabalho.

A todos os professores e colegas do PIPE, que tornaram este período muito mais agradável.

RESUMO

O biodiesel pode ser classificado como, qualquer combustível alternativo atóxico, de natureza renovável, biodegradável, que possa oferecer vantagens sócio-econômicas e ambientais ao ser empregado na substituição total ou parcial do diesel de petróleo. Atualmente, as microalgas têm surgido como fonte de energia sustentável para a produção de biodiesel. Neste trabalho, foram realizados experimentos utilizando catálise enzimática em meio heterogêneo para obtenção de biodiesel de microalgas. Os resultados obtidos neste trabalho são inéditos, uma vez que foram produzidas lipases por fermentação no estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm), a partir de fungos endofíticos isolados das folhas de mamona (*Ricinus communis* L.). Outro ponto importante deste trabalho é a produção enzimática de biodiesel a partir de microalgas, uma vez que poucos trabalhos foram encontrados na literatura sobre este tema. A biomassa da microalga *Scenedesmus* spp. (valor máximo 22,96 g.L⁻¹) foi obtida via cultivo heterotrófico. Desta biomassa foram extraídos, via saponificação, um teor de 5,57% ácidos graxos, sendo observada a predominância dos ácidos oleico, palmítico e linoleico em sua composição. Para a produção de lipases, três cepas fúngicas foram selecionadas: *Candida guilliermondii*, *Penicillium sumatrense* e *Aspergillus fumigatus*. A enzima de *C. guilliermondii* (valor máximo 25,11 U.mL⁻¹) foi produzida por FSm, e otimizada através de planejamento experimental. A produção das enzimas de *P. sumatrense* e *A. fumigatus* foi realizada através da FES e FSm; como os resultados mais expressivos foram observados na FES, esta foi escolhida para a produção dos biocatalisadores aplicados nas reações de síntese. As lipases obtidas foram empregadas em diferentes preparações: imobilizadas no sólido fermentado; no extrato bruto; no extrato bruto acrescido de sorbitol 1% e imobilizadas por adsorção e ligação covalente. A lipase de *C. guilliermondii* apresentou rendimento máximo de 86% de conversão em oleato de metila em 72 h para a enzima imobilizada em sílica ativada. As enzimas de *P. sumatrense* e *A. fumigatus* apresentaram rendimentos superiores e tempos de reação mais curtos do que a enzima de *C. guilliermondii*; sendo que os maiores rendimentos foram obtidos quando as enzimas foram imobilizadas diretamente no sólido fermentado (90% de conversão em 10 h de reação). Outro ponto de destaque para a utilização do sólido fermentado foi a possibilidade de reutilização das enzimas. A enzima de *A. fumigatus* apresentou meia vida apenas no décimo terceiro reciclo. As mesmas preparações enzimáticas foram aplicadas na síntese do biodiesel de microalgas, sendo novamente os resultados de maior expressividade obtidos para os sólidos fermentados de *P. sumatrense* e *A. fumigatus*. Quando se aplicou o sólido fermentado e delipidado contendo a lipase de *A. fumigatus*, o rendimento máximo (98%) na conversão em ésteres metílicos foi semelhante ao do sólido fermentado não delipidado de *P. sumatrense* (96%) em 12 h de reação. Com estes resultados é possível observar que mesmo que a catálise enzimática ainda apresente algumas limitações, seu emprego em larga escala pode ser alcançado com a utilização de recursos que viabilizem economicamente sua aplicação, como no caso deste trabalho, onde a utilização do sólido fermentado apresentou alto desempenho e baixo custo de obtenção.

Palavras-chave: lipase, ésteres metílicos, sólido fermentado.

ABSTRACT

Biodiesel can be classified as a non-toxic, renewable and biodegradable fuel that shows social, economic and ecologic advantages when used as a total or partial substitute of petrol derived diesel. Today, microalgae has emerged as a source of sustainable energy for biodiesel production. In this work it was performed experiments employing enzymatic catalysis in heterogeneous medium to obtain biodiesel from microalgae oil. The results obtained in this work are novel once it was produced lipase by solid-state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF) employing endophytic fungus isolated from castor bean leaves (*Ricinus communis* L.). Another important topic of this work is the enzymatic biodiesel production from microalgae, once only a few publications were found about this theme. The biomass from the microalgae *Scenedesmus* ssp. (highest value 22.96 g.L⁻¹) was obtained by heterotrophic culture. From this biomass it was extracted by saponification the fat acids, which presented a content of 5.57%. The fat acids from this microalgae were composed mainly by oleic, palmitic and linoleic acids. For the lipase production, three fungal strains were selected: *Candida guilliermondii*, *Penicillium sumatrense* and *Aspergillus fumigatus*. The *C. guilliermondii* enzyme (highest value 25.11 U.mL⁻¹) was produced by SmF and optimized by experimental design. The enzyme production from *P. sumatrense* and *A. fumigatus* was realized by SSF and SmF. Since the most expressive results were obtained by SSF, it was chosen for the production of the biocatalyst employed in the synthesis reaction. The obtained lipases were employed in different preparation: immobilized in the fermented solid; crude extract; crude extract with 1% of sorbitol; immobilized by adsorption and by covalent bond. The *C. guilliermondii* lipase presented a highest methyl oleate conversion yield of 86% in 72 hours when immobilized in activated silica. The *P. sumatrense* and *A. fumigatus* enzymes presented higher yields in shorter time when compared to *C. guilliermondii* enzyme. The highest yields were obtained when the enzymes were immobilized directly in the fermented solid (90% yield in 10 hours of reaction). Another advantage presented by the fermented solid employment was the possibility of the enzyme reuse. The *A. fumigatus* enzyme presented a half-life of 13 recycles. The same enzymatic preparations were applied in biodiesel synthesis from microalgae oil and once again the solid fermented by *P. sumatrense* and *A. fumigatus* presented the most expressive results. When the fat-free fermented solid containing *A. fumigatus* lipase was employed, the highest methyl ester conversion yield (98%) was similar to the yield presented by the solid fermented by *P. sumatrense* (96%) after 12 hours of reaction. With these results it is possible to observe that, even with some limitations, the large-scale employment of enzymatic catalysis can be reached with the use of some resources that make the process economically viable, such as the use of fermented solid that showed high performance and low obtainment cost in this work.

Key-words: lipase, methyl esters, fermented solid

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Reação de transesterificação (Fonte: RODRIGUES, 2009)	24
Figura 2.	Reação geral de hidrólise de triacilgliceróis catalisada por lipases (Fonte: FERNANDES, 2006)	25
Figura 3.	Representação da fermentação no estado sólido (A) e da fermentação submersa (B) (Fonte: FERNANDES, 2006)	28
Figura 4.	Reações catalisadas por lipases (Fonte: PAQUES e MACEDO, 2006).....	30
Figura 5.	Métodos de imobilização de enzimas (Fonte: DALLA-VECCHIA <i>et al.</i> , 2004)	34
Figura 6.	Gráficos de superfícies de resposta que apresentam a interação entre as concentrações de (A) glucose e fosfato de sódio; (B) glucose e nitrato de sódio e (C) fosfato de sódio e nitrato de sódio na produção de biomassa	56
Figura 7.	Halo indicativo da produção de enzimas lipolíticas em meio contendo óleo de oliva como fonte de carbono e o corante rodamina B	58
Figura 8.	Gráficos de superfícies de resposta que apresentam a interação entre as concentrações de (A) óleo de oliva e sulfato de amônio; (B) Tween 80 e sulfato de amônio e (C) Tween 80 e óleo de soja na produção de lipases por <i>Candida guilliermondii</i>	61
Figura 9.	Produção de lipases através de fermentação no estado sólido pelos fungos <i>Penicillium sumatrense</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	64
Figura 10.	Efeito do solvente na esterificação do ácido oleico com etanol e metanol catalisada pela lipase de <i>Candida guilliermondii</i> Condições: 2000U, razão molar 1:4, 72 horas de reação a 30 °C e 180 rpm.	66
Figura 11.	Efeito da razão molar ácido:álcool na esterificação do ácido oleico com etanol e metanol catalisada pela lipase de <i>Candida guilliermondii</i> . Condições: 2000 U, solvente hexano, 72 horas de reação a 30 °C e 180 rpm.	68
Figura 12.	Conversão do ácido oleico em oleato de metila pelas enzimas imobilizadas e livre de <i>Candida guilliermondii</i> . Condições: 700U,	

	razão molar 1:9, solvente hexano, 72 horas de reação a 30 °C e 180 rpm.	69
Figura 13.	Atividade residual das enzimas de <i>Candida guilliermondii</i> imobilizadas após reutilizações.	71
Figura 14.	Esterificação do ácido oleico pelos sólidos fermentados obtidos de <i>Penicillium sumatrense</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i> . Condições: 60U, razão molar 1:9, solvente hexano, 30 °C e 180 rpm.	72
Figura 15.	Efeito da razão molar entre ácido e álcool na esterificação do ácido oleico catalisada pelas lipases de <i>Penicillium sumatrense</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i> . Condições: 60U, solvente hexano, 24 horas de reação 30 °C e 180 rpm.	73
Figura 16.	Efeito do solvente na esterificação do ácido oleico catalisada pelas lipases de <i>Penicillium sumatrense</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i> . Condições: 60U, razão molar 1:9, solvente hexano, 24 horas de reação 30 °C e 180 rpm.	74
Figura 17.	Reutilização dos sólidos fermentados de <i>Penicillium sumatrense</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i> na síntese do oleato de metila.	76
Figura 18.	Esterificação do ácido oleico utilizando as lipases de (A) <i>Penicillium sumatrense</i> e (B) <i>Aspergillus fumigatus</i> no extrato bruto e acrescidas de sorbitol 1%. Condições: 60U, razão molar 1:9, solvente hexano, 30 °C e 180 rpm.	78
Figura 19.	Recuperação da atividade enzimática de <i>Penicillium sumatrense</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i> após o processo de imobilização.	79
Figura 20.	Esterificação do ácido oleico utilizando as lipases de (A) <i>Penicillium sumatrense</i> e (B) <i>Aspergillus fumigatus</i> imobilizadas. Condições: 60U, razão molar 1:9, solvente hexano, 30 °C e 180 rpm.	80
Figura 21.	Grupos funcionais identificados pelo espectro do RMN de ¹ H do oleato de metila.	82
Figura 22.	Esterificação do óleo de microalgas utilizando o sólido fermentado sem tratamento e delipidado de (A) <i>Penicillium sumatrense</i> e (B) <i>Aspergillus fumigatus</i> . Condições: 60U, razão molar 1:9, solvente hexano, 30 °C e 180 rpm.	83
Figura 23.	Grupos funcionais identificados pelo espectro do RMN de ¹ H do biodiesel de microalgas.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Principais produções científicas desenvolvidas pelo NPDEAS de 2008 a 2013.....	22
Tabela 2.	Micro-organismos produtores de lipases	27
Tabela 3.	Vantagens e desvantagens do processo químico e enzimático na produção de biodiesel	31
Tabela 4.	Reações de esterificação e transesterificação catalisadas por lipases	33
Tabela 5.	Níveis propostos para as variáveis do planejamento experimental para produção de biomassa de <i>Scenedesmus</i> spp.	40
Tabela 6.	Níveis propostos para as variáveis do planejamento experimental para a produção de lipases por <i>Candida guilliermondii</i>	43
Tabela 7.	Matriz do planejamento experimental e resultados obtidos para a produção de biomassa de <i>Scenedesmus</i> spp.	54
Tabela 8.	Estimativa do efeito das variáveis para a produção de biomassa de <i>Scenedesmus</i> spp.	55
Tabela 9.	Perfil dos ácidos graxos obtidos da microalga <i>Scenedesmus</i> spp. através de cultivo heterotrófico.	57
Tabela 10.	Matriz do planejamento experimental e resultados obtidos para a produção de lipases por <i>Candida guilliermondii</i>	60
Tabela 11.	Estimativa dos efeitos das variáveis para a produção de lipases por <i>Candida guilliermondii</i>	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANP	Agência Nacional do Petróleo
BDA	Ágar batata dextrose
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CO_2	Dióxido de carbono
FAME	Fatty Acid Methyl Esther
FES	Fermentação no estado sólido
FSm	Fermentação submersa
HCl	Ácido clorídrico
Na_2HPO_4	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
pNPB	Butirato de p-nitrofenila
pNPP	Palmitato de p-nitrofenila
PVA	Álcool polivinílico
PVC	Cloreto de polivinila
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
rpm	Rotações por minuto
U	Unidades de atividade enzimática
U.gSS^{-1}	Unidades por grama de substrato sólido
U.mL^{-1}	Unidades por mililitro
UV	Ultravioleta
P	Parâmetro estatístico
Log P	Polaridade do solvente

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	16
1.1 ORGANIZAÇÃO DO DOCUMENTO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 MICROALGAS NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL	19
2.1.1 Características gerais	19
2.1.2 Obtenção de biomassa de microalgas por cultivo heterotrófico	20
2.2 BIODIESEL	23
2.2.1 Processos de obtenção de biodiesel	24
2.3 LIPASES	25
2.3.1 Micro-organismos aplicados na obtenção de lipases	26
2.3.2 Processos fermentativos para obtenção de lipases microbianas	28
2.3.3 Aplicação de lipases na síntese de ésteres	30
2.3.4 Imobilização de enzimas	34
3. DESAFIOS E OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 REAGENTES	38
4.2 MICRO-ORGANISMOS	38
4.3 CULTIVO HETEROTRÓFICO DE MICROALGAS <i>Scenedesmus</i> spp.	39
4.3.1 Obtenção do inóculo	39
4.3.2 Otimização da produção de microalgas por cultivo heterotrófico	39
4.3.3 Extração dos ácidos graxos da biomassa de <i>Scenedesmus</i> spp.	40
4.3.4 Identificação dos ácidos graxos de <i>Scenedesmus</i> spp.	41

4.4 SELEÇÃO DE CEPAS MICROBIANAS PARA PRODUÇÃO DO BIOCATALISADOR	41
4.5 PREPARO DO INÓCULO	42
4.6 PRODUÇÃO DE LIPASES da levedura <i>Candida guilliermondii</i>	42
4.6.1 Otimização da produção de lipases de <i>Candida guilliermondii</i> utilizando planejamento experimental 2 ⁶⁻³	42
4.6.2 Produção da enzima em biorreator	43
4.6.3 Purificação parcial da enzima com sulfato de amônio	44
4.7 PRODUÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS DE <i>Penicillium sumatrense</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	44
4.7.1 Produção de lipases fúngicas por FES	44
4.7.2 Recuperação da enzima do sólido fermentado	45
4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	46
4.8.1 Método titulométrico	46
4.8.2 Método de hidrólise do pNPP	46
4.9 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA	47
4.10 ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO PELA LIPASE DE <i>Candida guilliermondii</i>	47
4.10.1 Escolha do melhor solvente e razão molar para a síntese do oleato de etila e metila	47
4.10.2 Síntese do oleato de metila com enzimas imobilizadas. .	48
4.10.3 Reutilização das enzimas imobilizadas	49
4.11 ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO PELAS LIPASES DE <i>Penicillium sumatrense</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	49
4.11.1 Reação de esterificação com adição direta do sólido fermentado.....	49
4.11.2 Escolha do melhor solvente e razão molar para a síntese do oleato de metila	49
4.11.3 Reutilização do sólido fermentado	50
4.11.4 Reações com outras preparações enzimáticas	50
4.12 ESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MICROALGAS	50
4.12.1 Reação de esterificação com adição direta do sólido fermentado de <i>Penicillium sumatrense</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i> .	50
4.13 ANÁLISE DOS ÉSTERES OBTIDOS	51

4.13.1 Método de Lowry-Tinsley	51
4.13.2 Cromatografia gasosa	51
4.13.3 RMN ¹ H	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1 CULTIVO HETEROTRÓFICO DE MICROALGAS <i>Scenedesmus spp.</i>	53
5.1.1 Otimização da produção de microalgas por cultivo heterotrófico	53
5.1.2 Obtenção do óleo de microalgas	57
5.2 SELEÇÃO DE CEPAS MICROBIANAS PARA PRODUÇÃO DO BIOCATALISADOR	58
5.3 PRODUÇÃO DE LIPASES pela levedura <i>Candida guilliermondii</i>	59
5.3.1 Otimização da produção de lipases de <i>Candida guilliermondii</i> utilizando planejamento experimental 2 ⁶⁻³	59
5.3.2 Produção da enzima em biorreator	62
5.4 PRODUÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS DE <i>Penicillium sumatrense</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	64
5.5 ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO PELA LIPASE DE <i>Candida guilliermondii</i>	65
5.5.1 Escolha do melhor solvente e razão molar	65
5.5.2 Síntese com as enzimas imobilizadas	69
5.5.3 Reutilização das enzimas imobilizadas	71
5.6 ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO PELAS LIPASES DE <i>Penicillium sumatrense</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	72
5.6.1 Reação com adição direta do sólido fermentado	72
5.6.2 Escolha do melhor solvente e razão molar	73
5.6.3 Reutilização do sólido fermentado	75
5.6.4 Reações com outras preparações enzimáticas	77
5.6.5 Caracterização do oleato de metila	81
5.7 ESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MICROALGAS	82
5.7.1 Reação de esterificação com adição direta do sólido fermentado de <i>Penicillium sumatrense</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	82
6. CONCLUSÃO	86
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
APÊNDICE	98
ANEXOS	104

1. INTRODUÇÃO

Um dos setores que mais tem aplicado recursos biotecnológicos é o setor de biocombustíveis. Biocombustíveis são combustíveis provenientes de fontes renováveis, e estes tem ganhado grande espaço nos últimos tempos, devido a fatores como a futura escassez de recursos não renováveis como o petróleo, e também a poluição gerada por estas fontes (LIMA *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2013; RODRIGUES, 2009).

O uso de energias renováveis não é mais uma opção, mas sim uma necessidade, o que torna essencial o desenvolvimento de métodos para a obtenção de biocombustíveis (BAJAJ *et al.*, 2010). Para tal, deverão ser traçadas estratégias energéticas, com a finalidade de não prejudicar outros setores.

O biodiesel, segundo normas da ANP, consiste em ésteres alquílicos obtidos de óleos vegetais ou gorduras animais com álcoois de cadeias curtas. O Brasil é um país dependente de sua malha rodoviária, e o diesel é o combustível mais empregado. O biodiesel vem sendo gradativamente adicionado ao diesel. Para a adição de maiores quantidades de biodiesel são necessárias novas pesquisas que venham a garantir a qualidade de sua fabricação (LÔBO e FERREIRA, 2009; MARQUES *et al.*, 2010). Atualmente, a produção de biodiesel é capaz de suprir 10% mercado nacional de diesel, mas apenas 5% é incorporado ao diesel.

No Brasil as matérias-primas mais empregadas são o óleo de soja, e em uma menor porcentagem o sebo. Estas duas fontes são as mais facilmente obtidas no país, a soja devido a sua grande produção no país e o sebo por ser um subproduto.

A aplicação de novas matérias-primas pode ser uma boa solução, e uma das fontes de obtenção de óleo que promete ser muito promissora são as microalgas. As microalgas são seres microscópicos fotossintéticos com necessidades nutricionais relativamente simples, e tem um excelente potencial para geração de biocombustíveis, pois apresentam vantagens como a compactação do espaço necessário para seu cultivo, além de poder ser usado como fonte de nutrientes para seu cultivo, os resíduos agroindustriais

(ANDRADE e COSTA, 2008; DERNER *et al.*, 2006). Ela vem sendo uma ideia cada vez mais cogitada, pois apresenta vantagens como: a redução da área necessária para a obtenção da biomassa, além de não haver disputa pelas áreas agriculturáveis destinadas a produção de alimentos (AHMAD *et al.*, 2011; LIANG, 2012).

No processo de obtenção do biodiesel faz-se necessário o emprego de catalisadores, sendo que estes podem ser ácidos, bases, catalisadores heterogêneos ou ainda enzimas (LIMA *et al.*, 2007).

A catálise enzimática vem sendo estudada devido às vantagens apresentadas, como a seletividade destes catalisadores, que leva a um produto final mais puro, pois não há reações secundárias, além da fácil separação do catalisador e da glicerina do produto (GAMBA, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2012b).

Este processo apesar de apresentar diversas vantagens ainda possui sérias limitações. A principal é o tempo de duração da reação, embora a reação enzimática ocorra em temperaturas bem mais brandas do que as reações com catalisadores químicos, o longo tempo que ela necessita para ocorrer desencadeia um maior gasto de energia do que as comumente usadas (LIU *et al.*, 2013; SALUM *et al.*, 2010). Porém, a aplicação de biocatalisadores tem sido bastante estudada devido à apresentação de características interessantes no produto obtido. O alto grau de pureza do produto obtido é a principal vantagem deste método, porém os rendimentos alcançados por esse tipo de catálise ainda não conseguem superar os obtidos por catálise química, o que faz com que seu estudo e otimização sejam tão relevantes (CONTESINI *et al.*, 2010; SHARMA *et al.*, 2001).

Outro ponto bastante discutido é o custo do emprego destes catalisadores. As fermentações comumente usadas para obtenção de enzimas microbianas geralmente necessitam de nutrientes caros, aumentando o custo do biocatalisador. Porém, com métodos alternativos de obtenção de enzimas, como é o caso da fermentação no estado sólido (FES) é possível empregar resíduos como substrato e suportes inertes, que podem ser reutilizados, tornando a utilização destes biocatalisadores mais viáveis economicamente (BARRIOS-GONZÁLES, 2012; BUSSAMARA *et al.*, 2010).

Neste contexto, foi realizada uma revisão de literatura tratando de alguns aspectos de biocatálise e de produção de microalgas visando fornecer elementos necessários para a elaboração deste trabalho.

1.1 ORGANIZAÇÃO DO DOCUMENTO

Esse documento encontra-se dividido em 6 seções. A primeira seção apresentou a introdução e a organização do documento. A segunda seção apresenta uma revisão bibliográfica acerca dos assuntos abordados nessa dissertação: microalgas, biodiesel e produção, aplicação e imobilização de biocatalisadores. Na terceira seção demonstra-se os desafios e objetivos propostos. A quarta seção consiste das metodologias e materiais utilizados nesse trabalho para se obter os resultados, que estão apresentados e discutidos na quinta seção. Por fim, a quinta parte desse documento apresenta a conclusão a que se permite chegar através desse trabalho e recomendações para trabalhos futuros. Nos anexos são apresentados os cromatogramas, os espectros de RMN ^1H e os meios de cultivo para produção de microalgas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROALGAS NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

2.1.1 Características gerais

Microalgas são organismos fotossintéticos geralmente microscópicos. Estes organismos têm necessidades nutricionais simples, podendo até serem aplicados resíduos agroindustriais como fontes de nutriente para sua produção (ANDRADE e COSTA, 2008; CHAICHALERM *et al.*, 2012).

A produção de microalgas teve seu início na década de 1960, e sua produção era direcionada a suplementação nutricional e a recuperação de águas degradadas (BERTOLDI *et al.*, 2008).

Nos últimos tempos a produção de microalgas ganhou um novo foco, a produção voltada para o desenvolvimento energético. A biomassa microalgal pode conter alto teor de lipídios, o que despertou o interesse das pesquisas voltadas para a produção de biodiesel (DERNER *et al.*, 2006, TAN e LIN, 2012).

A utilização do óleo extraído da biomassa microalgal tem sido bastante explorada, pois alguns fatores levam a crer que a produção de biodiesel a partir deste óleo pode apresentar algumas vantagens sobre a utilização de oleaginosas além de ser possível a obtenção de produtos de alto valor agregado, como os suplementos alimentares, a partir dos subprodutos da produção do óleo, tornando a produção ainda mais viável economicamente (CAMPOS *et al.*, 2010; CHAICHALERM *et al.*, 2012).

Uma das principais razões pelo atual interesse na utilização de microalgas no setor energético é sua obtenção em espaços compactos, não ocasionando competição com áreas agriculturáveis, como no caso das oleaginosas. Pode-se tomar como exemplo a produção de microalgas com baixo conteúdo lipídico (30% lipídios), que apresentam produtividade de 58.700

litros de óleo por hectare/ano enquanto que a produtividade de uma oleaginosa como a soja (18% lipídios) é de 636 litros (AHMAD *et al.*, 2011).

Outro fator determinante na eleição das microalgas como matéria-prima para produção de biodiesel é a composição de seu material graxo. Assim como o teor lipídico da biomassa varia entre as diversas espécies, o perfil dos ácidos graxos produzidos também varia, porém a grande maioria dos autores destaca a similaridade do perfil dos ácidos graxos das microalgas com o das oleaginosas destacando a significativa produção do ácido oleico, ácido graxo geralmente presente em oleaginosas. (TAN e LIN, 2012).

2.1.2 Obtenção de biomassa de microalgas por cultivo heterotrófico

As microalgas são micro-organismos fotossintetizantes capazes de apresentar três metabolismos distintos frente a fonte de carbono disponível para crescimento: o metabolismo autotrófico, onde na presença de luz e determinados sais minerais a microalga é capaz de fixar dióxido de carbono; o metabolismo heterotrófico, onde a microalga necessita de uma fonte de carbono orgânica presente no meio de cultivo na ausência de luminosidade e o metabolismo mixotrófico, onde são desenvolvidas em conjunto as duas formas metabólicas anteriores (AHMAD *et al.*, 2011; AMARO *et al.*, 2011).

O cultivo autotrófico apresenta um apelo ambiental, uma vez que na presença de luz a microalga é capaz de captar o dióxido de carbono presente no ar atmosférico, um dos principais vilões do efeito estufa. Este processo seria pertinente quando aplicado à produção de biomassa microalgal para desenvolvimento de biocombustíveis, pois o dióxido de carbono é o principal gás emitido na queima destes, o que ocasionaria um balanço energético favorável. Porém, sérias limitações dificultam o sucesso deste processo, sendo a principal limitação a concentração final de biomassa microalgal que raramente apresenta rendimentos muito superiores a 1 g.L^{-1} ao final do cultivo (AZMA *et al.*, 2011, ZHENG *et al.*, 2012). O grande gargalo deste processo está em otimizar os rendimentos da produção de biomassa, e para isso são necessários desenvolvimento de fotobiorreatores eficientes na captação de

luminosidade, bem como aprimoramento dos meios de cultivo propostos (FENG *et al.*, 2011, ZHENG *et al.*, 2012).

O cultivo heterotrófico tem apresentado relevantes resultados na produção de biomassa microalgal, sendo os rendimentos significativamente superiores ao cultivo autotrófico. A utilização do metabolismo heterotrófico é questionada no sentido de ser necessária a adição de uma fonte de carbono orgânica para o crescimento da microalga, o que pode acarretar custos elevados (FENG *et al.*, 2011, LIANG *et al.*, 2013).

As principais fontes de carbono aplicadas a este cultivo são a glucose, o glicerol e o acetato de sódio. A glucose é a fonte de carbono que tem apresentado os melhores resultados para o crescimento heterotrófico, porém o glicerol vem surgindo como uma excelente opção para este cultivo, apresentando além de bons resultados a possibilidade da reutilização de um subproduto da produção do biodiesel (FENG *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2012). Diversas fontes alternativas como águas residuais, melaço de cana e carboidratos hidrolisados (como o amido de mandioca) tem sido propostos para aplicação como fontes de carbono para este cultivo, sendo sua eficiência ditada pela capacidade de metabolização de cada espécie de microalga (LIANG *et al.*, 2013).

O Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS), situado na Universidade Federal do Paraná, produz microalgas com a finalidade de produzir óleo e, posteriormente, biodiesel. O objetivo é ser um prédio autossustentável, produzindo toda a energia consumida a partir desses micro-organismos.

Na tabela 1 é possível observar as principais produções bibliográficas do grupo de pesquisa.

Tabela 1. Principais produções científicas desenvolvidas pelo NPDEAS de 2008 a 2013.

PATENTES	
Vargas <i>et al.</i> , 2011.	Photobioreactor System (Depósito nos Estados Unidos da América) US2012088296-A1 / WO2012050608-A1.
ARTIGOS	
Ribeiro <i>et al.</i> , 2008.	Transient modeling and simulation of compact photobioreactor.
Torrens <i>et al.</i> , 2008.	Biodiesel from microalgae: the effect of fuel properties on pollutant emissions.
Morais <i>et al.</i> , 2009.	Phaeodactylum tricornutum microalgae growth rate in heterotrophic and mixotrophic conditions.
Ribeiro <i>et al.</i> , 2009.	The temperature response of compact tubular microalgae photobioreactors.
Carvalho Júnior <i>et al.</i> , 2011.	Microalgae biodiesel via in situ methanolysis.
Satyanarayana, Mariano e Vargas, 2011.	A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials.
D'Aquino <i>et al.</i> , 2012.	A simplified mathematical model to predict PVC photodegradation in photobioreactors.
Oliveira <i>et al.</i> , 2012a.	Comparação entre três bioprocessos para a produção de enzimas proteolíticas utilizando resíduos agroindustriais.
Oliveira <i>et al.</i> , 2012b.	Production of methyl oleate with a lipase from an endophytic yeast isolated from castor leaves.
Oliveira <i>et al.</i> , 2013.	Utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por fermentação submersa.
Silva <i>et al.</i> , 2013.	Life cycle assessment of biomass production in microalgae compact photobioreactors. (aceito para publicação).
Sugai-Guerios <i>et al.</i> , 2013	Mathematical model of the CO ₂ solubilization reaction rates developed for the study of photobioreactors. (aceito para publicação).
CAPÍTULO DE LIVRO	
Soares <i>et al.</i> , 2010.	Metodologias para obtenção de biomassa e extração de lipídeos de microalgas marinhas. In: Pereira, T. C. G. (Copel - Paraná). Dossiê de Pesquisa Fontes Renováveis de Energia.

2.2 BIODIESEL

Muito antes da crise energética dos anos 70, a utilização de óleos vegetais e gorduras animais já eram investigadas para aplicação como combustíveis em motores do ciclo diesel. Porém a utilização direta de gorduras e óleos apresentou uma série de problemas como o acúmulo de materiais oleosos nos bicos de injeção, a queima ser incompleta, rendimento de potência baixo, dentre outros. Contudo, alternativas para a aplicação destes materiais graxos começaram a ser propostos, com a finalidade de reduzir estes inconvenientes (KNOTHE *et al.*, 2006; LÔBO e FERREIRA, 2009).

Processos como o de diluição, de micro-emulsão em metanol ou etanol, craqueamento e transesterificação foram empregados visando reduzir os problemas gerados por estes materiais, sendo a transesterificação o processo mais empregado por apresentar um produto de propriedades similares ao petrodiesel (KNOTHE *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2007).

Segundo a ANP (2008), o biodiesel considerado B100 é um combustível composto por alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa derivados de óleo vegetal ou gordura animal.

O biodiesel apresenta entre suas características a total miscibilidade com o diesel de petróleo, podendo ser utilizada uma mistura em qualquer proporção entre os dois (RODRIGUES, 2009).

Este biocombustível apresenta uma série de características vantajosas que tornam a sua aplicação muito interessante, como:

- i. Ser derivado de matérias-primas renováveis;
- ii. Ser biodegradável;
- iii. Não tóxico;
- iv. Reduzir as emissões de gases poluentes;
- v. Possuir alto ponto de fulgor, tornando o seu armazenamento mais seguro;
- vi. As fontes de matéria-prima em grande maioria são fotossintéticas, absorvendo CO₂, podendo gerar no balanço final uma redução de até 78% na emissão deste gás em comparação ao diesel.

2.2.1 Processos de obtenção de biodiesel

Para a obtenção do biodiesel a partir de óleos e gorduras é necessário o emprego da reação de transesterificação (Figura 1). Esta reação ocorre com a esterificação dos ácidos graxos presentes no triacilglicerídeo por um álcool (geralmente etanol e metanol), na presença de um catalisador (SUAREZ, *et al.*, 2009).

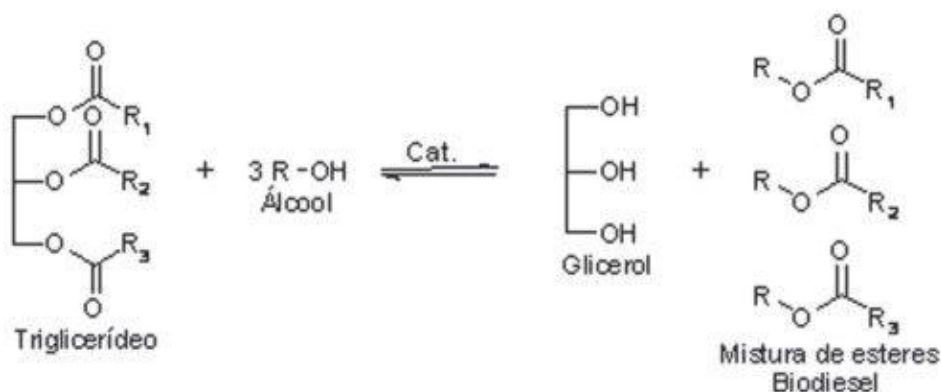


Figura 1. Reação de transesterificação (Fonte: RODRIGUES, 2009).

O catalisador escolhido é de suma importância, pois é a partir dele que serão estabelecidas as características do processo empregado, como a temperatura da reação e a separação do biodiesel da glicerina, dentre outros (KNOTHE *et al.*, 2006; SUAREZ *et al.*, 2009). Existem três tipos básicos de catalisadores utilizados neste processo:

- i. Catalisador homogêneo: este catalisador é um ácido ou uma base. É denominado homogêneo por estar no mesmo estado físico que os reagentes. A catálise mais aplicada é a básica, utilizando o NaOH como catalisador, que gera um maior rendimento e um tempo mais curto de reação. Porém esta técnica apresenta limitações que são a difícil separação entre o produto e o catalisador, além de reações secundárias, como a de saponificação.
- ii. Catalisador heterogêneo: também chamados de catalisadores sólidos. São geralmente empregados argilominerais, diversos tipos de óxidos, e até polímeros reticulados. Possuem vantagens como a fácil separação

do produto e do catalisador, porém o longo tempo necessário para formação de produto neste tipo de reação ainda não é satisfatório.

- iii. Catalisador biológico: neste processo enzimas (geralmente lipases) são empregadas como catalisadores. Este método apresenta algumas vantagens sobre os anteriores como: a especificidade da reação catalisada pela enzima que não gera produtos secundários, a baixa energia de ativação necessária, além de a reação ocorrer em temperaturas brandas. A principal limitação desta técnica é o longo tempo de reação. Os catalisadores biológicos, assim como os heterogêneos, despertam a atenção pela sua insolubilidade no meio reacional, o que torna possível reutilizar estes por diversos ciclos, enquanto que na catalise homogênea o catalisador é perdido durante o processo.

2.3 LIPASES

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas responsáveis pela catálise da reação de hidrólise de triacilgliceróis (Figura 2), e que *in vitro* podem realizar a reação inversa, catalisando as reações de síntese de ésteres (FERNANDES, 2006; DIAZ *et al.*, 2006).

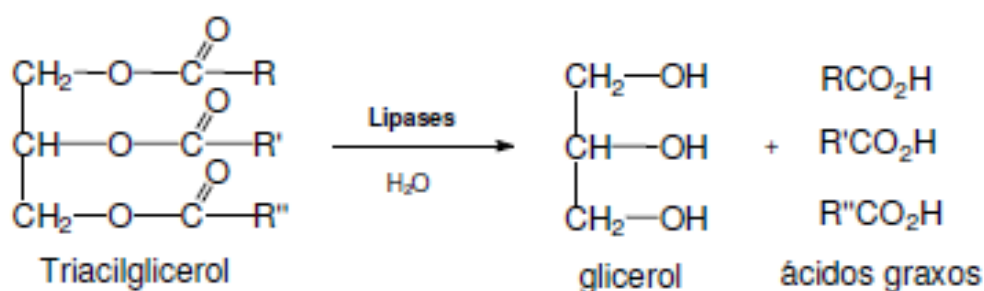


Figura 2. Reação geral de hidrólise de triacilgliceróis catalisada por lipases.
(Fonte: FERNANDES, 2006)

Por serem enzimas metabolicamente necessárias para a digestão de lipídios, as lipases podem ser encontradas em todos os tipos de organismos vivos (CONTESINI *et al.*, 2010; SALIHU *et al.*, 2012). As lipases primordialmente observadas foram as provenientes de plantas e animais, como é o caso da lipase pancreática porcina, que vem sendo aplicada comercialmente até hoje, como por exemplo em fármacos que atuam como auxiliares digestivos. A grande limitação da aplicação de lipases vegetais e animais é sua obtenção, que se torna dispendiosa devido à necessidade de grandes quantidades de material vegetal para obtenção de quantidades adequadas de enzimas ou ainda do abate de animais, acarretando alto custo e inviabilizando sua aplicação industrial em larga escala (SALIHU *et al.*, 2011; SHARMA *et al.*, 2001).

As lipases microbianas, comumente obtidas a partir de alguns gêneros de bactérias e fungos filamentosos, apresentam um excelente potencial para seu emprego em diversos bioprocessos, pois apresentam características desejáveis como: estabilidade em solventes orgânicos, não necessitarem de cofatores e atuarem em uma ampla gama de substratos (GUAN *et al.*, 2010; JAEGER e REETZ, 1998).

As boas propriedades bioquímicas apresentadas pelas lipases microbianas levam à eficiência do emprego destas em reações tanto de síntese como de hidrólise dos mais diversos ésteres, porém outro ponto relevante que pode ser citado na obtenção de lipases de micro-organismos é o curto tempo de obtenção destas, pois através de processos fermentativos adequados é possível obter grandes quantidades de enzima em um curto espaço de tempo, capazes de suprir demandas industriais (BUSSAMARA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2012b).

2.3.1 Micro-organismos aplicados na obtenção de lipases

Dentre as várias fontes de obtenção de lipases, os micro-organismos são a fonte que mais desperta interesse devido à sua capacidade de secretar

enzimas que apresentam alta versatilidade de aplicação e de características bioquímicas (SHARMA *et al.*, 2001).

As bactérias têm sido amplamente estudadas na produção de enzimas lipolíticas, principalmente via fermentação submersa por apresentarem uma maior adaptação a este sistema fermentativo. O gênero *Bacillus* destaca-se entre as bactérias devido as características apresentadas por suas enzimas, que geralmente atuam em uma ampla faixa de pH e são termoresistentes (GHORI *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012).

Os fungos filamentosos são outra fonte promissora de obtenção de lipases, com grande destaque para os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. As enzimas fúngicas geralmente apresentam características bioquímicas de atuação mais brandas quando comparadas as lipases bacterianas, porém sua aplicação em reações de interesse industrial tem sido amplamente descrita (CONTESINI *et al.*, 2010; LI e ZONG, 2010). Na Tabela 2 é possível observar alguns exemplos de micro-organismos produtores de lipases.

Tabela 2. Micro-organismos produtores de lipases.

Micro-organismo	Fermentação	Atividade enzimática	Referência
<i>Pseudozyma hubeiensis</i> HB85A	FSm	2,48 U.mL ⁻¹ (pNPB*)	Bussamara <i>et al.</i> , 2010
<i>Mucor racemosus</i>	FSm	75,00 U.mL ⁻¹ (óleo de oliva)	Mohamed <i>et al.</i> , 2011
<i>Candida cylindracea</i>	FSm	20,26 U.mL ⁻¹ (pNPP**)	Salihu <i>et al.</i> , 2011
<i>Rhizopus oligosporus</i>	FSm	9,07 U.mL ⁻¹ (pNPP)	Iftikhar <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus niger</i> 11T53A14	FES	56,60 U.gSS ⁻¹ (óleo de oliva)	Damaso <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhizopus</i> sp.	FES	74,00 U.gSS ⁻¹ (pNPP)	Hernández-Rodríguez <i>et al.</i> , 2009
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	FES	76,00 U.gSS ⁻¹ (tricaprilina)	Fernandes <i>et al.</i> , 2007
<i>Burkholderia</i> sp. C20	FSm	16,82 U.mL ⁻¹ (óleo de oliva)	Tran <i>et al.</i> , 2010
<i>Candida guilliermondii</i>	FSm	25,11 U.mL ⁻¹ (pNPP)	Este trabalho
<i>Aspergillus fumigatus</i>	FES	22,73 U.gSS ⁻¹ (pNPP)	Este trabalho

*pNPB: p-nitrofenil butirato

**pNPP: p-nitrofenil palmitato

2.3.2 Processos fermentativos para obtenção de lipases microbianas

Dois processos fermentativos distintos podem ser aplicados para produção de lipases bem como de outros metabólitos de origem microbiana: a fermentação submersa (FSm) e a fermentação no estado sólido (FES). Basicamente, o que difere os dois processos é o ambiente fornecido ao micro-organismo, sendo a adaptação biológica, um determinante do sucesso do processo fermentativo proposto. A representação da FES e da FSm pode ser observada na Figura 3.



Figura 3. Representação da fermentação no estado sólido (A) e da fermentação submersa (B). (Fonte: FERNANDES, 2006)

A fermentação submersa (FSm) é o processo mais comumente aplicado na produção de metabólitos microbianos. Neste tipo de fermentação, os nutrientes disponíveis ao micro-organismo encontram-se dissolvidos em um meio fermentativo líquido. Fontes de carbono, fontes de nitrogênio, sais minerais e vitaminas necessárias ao metabolismo microbiano e substratos indutores são encontrados neste meio fermentativo. Micro-organismos unicelulares como bactérias e leveduras têm sido descritos como os mais indicados a este processo, pois a fermentação submersa propicia contato direto entre a célula e o substrato, facilitando o processo de crescimento celular (FERNANDES *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2012a).

A fermentação no estado sólido (FES) baseia-se no crescimento dos micro-organismos em substratos sólidos na ausência (ou quase) de água livre

(FERNANDES, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2011), sendo um processo microbiano que geralmente ocorre na superfície dos materiais sólidos que têm capacidade de absorver água, podendo ou não conter nutrientes solúveis (BARRIOS-GONZÁLES, 2012).

Os principais substratos utilizados são produtos agroindustriais ou resíduos destes produtos, sendo estes principalmente formados por biomoléculas de lipídeos, carboidratos e proteínas, que representam as formas de energia para o crescimento microbiano. A utilização destas biomoléculas requer a secreção de enzimas hidrolíticas para sua metabolização por parte dos micro-organismos (DAMASO *et al.*, 2008; SALIHU *et al.*, 2012).

O material sólido utilizado para a FES geralmente é fragmentado, sendo de natureza fibrosa ou granular, característica necessária para a retenção de água. A quantidade de água presente varia de acordo com o material utilizado, pois esta quantidade depende diretamente da capacidade de absorção de cada material (FERNANDES, 2006).

As principais vantagens da fermentação no estado sólido são: o baixo custo, pois os substratos muitas vezes são resíduos que exigem pré-tratamentos simples; redução do volume dos biorreatores quando comparados à concentração de produtos gerados, pois a água está concentrada no substrato-suporte e a simplificação no processo de purificação, pois o líquido extrator está mais concentrado (FERNANDES *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2013).

A desvantagem mais evidente deste processo é a falta de mecanismo de controle de variáveis como o pH, umidade e oxigenação do meio, sendo muito difícil acompanhar durante a fermentação mudanças físico-químicas no meio fermentado (LIU *et al.*, 2013; PANDEY *et al.*, 1999).

A grande maioria dos micro-organismos utilizados no processo de fermentação no estado sólido são os fungos filamentosos (GERMANO, 2000; SALIHU *et al.*, 2012). A quantidade reduzida de água no substrato limita bastante o número de micro-organismos capazes de se adaptar a este processo, porém os fungos se mostram bastante tolerantes a este ambiente (FERNANDES, 2006).

Os fungos em geral apresentam uma boa capacidade de crescer sobre substratos sólidos naturalmente, o que explica sua boa adaptação a FES, e por

esse motivo eles têm sido largamente utilizados neste processo, principalmente para a obtenção de enzimas (BARRIOS-GONZÁLES, 2012).

2.3.3 Aplicação de lipases na síntese de ésteres

As lipases realizam uma série de reações de interesse industrial (Figura 4), porém as reações de esterificação e transesterificação destinadas à síntese de biodiesel vêm sendo amplamente estudadas. O principal objetivo é otimizar a aplicação destes biocatalisadores, de modo que possam concorrer economicamente com a aplicação de catalisadores químicos (CONTESINI *et al.*, 2010; RODRIGUES, 2009).

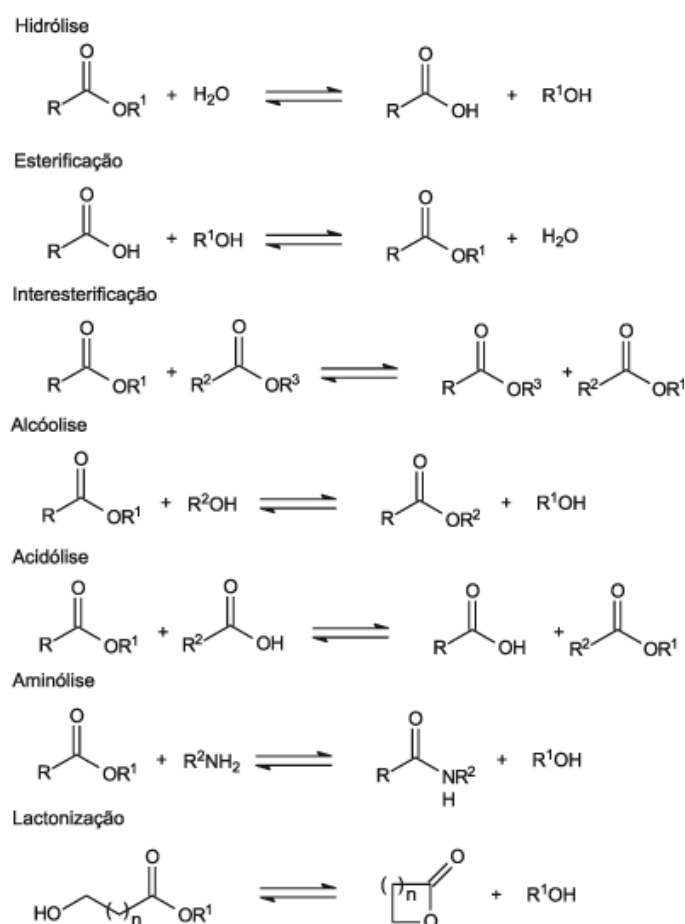


Figura 4. Reações catalisadas por lipases (Fonte: PAQUES e MACEDO, 2006).

O uso do biodiesel obtido por processos enzimáticos apresenta uma série de vantagens sobre o processo químico, sendo o custo e a demora da reação ainda as principais desvantagens do processo enzimático. Na Tabela 3 pode ser observada uma comparação entre os dois processos de obtenção do biodiesel.

Tabela 3. Vantagens e desvantagens do processo químico e enzimático na produção de biodiesel (FERNANDES, 2002).

Processos	Vantagens	Desvantagens
Químico	<ul style="list-style-type: none"> • Simplicidade • Alto rendimento • Curto tempo de reação 	<ul style="list-style-type: none"> • Dificuldade de separação do catalisador • Impossibilidade de reutilização do catalisador • Dificuldade de utilização de etanol hidratado • Obtenção de produtos com menor grau de pureza
Enzimático	<ul style="list-style-type: none"> • Facilidade de separação do catalisador • Obtenção de produtos mais puros • Permite o uso de etanol hidratado na reação 	<ul style="list-style-type: none"> • Longo tempo de reação • Custo das enzimas

O processo enzimático de produção de biodiesel ainda enfrenta sérias limitações para um futuro emprego em larga escala, devido ao longo tempo de reação e alto custo destes biocatalisadores (BAJAJ *et al.*, 2010; FERNANDES, 2006). Alguns empregos de lipases na síntese de ésteres podem ser observados na Tabela 4.

Os principais estudos voltados à viabilização da aplicação industrial de lipases na produção do biodiesel têm como foco aumentar a eficiência destas enzimas, com a finalidade de se obter tempos de reação compatíveis com os obtidos por catalisadores químicos e também a possibilidade de reutilização destes catalisadores (LI *et al.*, 2012). Ferramentas como a engenharia genética têm sido aplicadas frequentemente visando obter enzimas mais resistentes e específicas para estas aplicações. Outra técnica muito usada para obtenção de

enzimas mais resistentes e reutilizáveis é a imobilização enzimática, onde a enzima em questão torna-se um catalisador heterogêneo, sendo facilmente recuperada do meio reacional, para posteriores reutilizações (BAJAJ *et al.*, 2010; TAN *et al.*, 2010).

Tabela 4. Reações de esterificação e transesterificação catalisadas por lipases.

Lipase	Reação	Éster	Meio reacional	Tempo (h)	Conversão (%)	Referência
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	Esterificação	Oleato de etila	Heptano	8	76	Fernandes, 2006
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	Transesterificação	Ésteres etílicos do óleo de milho	Heptano	120	94,7	Fernandes <i>et al.</i> , 2007
<i>Candida rugosa</i>	Transesterificação	Ésteres metílicos do óleo de soja	Hexano	30	87	Xie e Wang, 2012
<i>Penicillium corylophilum</i>	Esterificação	<i>n</i> -butil oleato	Micelas reversas	12	100	Baron <i>et al.</i> , 2005
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	Transesterificação	Ésteres etílicos do óleo de soja	Ausência de solvente	46	95	Salum <i>et al.</i> , 2010
<i>Burkholderia</i> sp. C20	Transesterificação	Ésteres metílicos do óleo de microalgas	Hexano	48	97,3	Tran <i>et al.</i> , 2012
<i>Penicillium expansum</i>	Transesterificação	Ésteres metílicos do óleo de microalgas	Líquido iônico [BMIm] [PF ₆]	30	90,7	Lai <i>et al.</i> , 2011
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Esterificação	Laurato de etila	Micelas reversas	1	92	Fernandes <i>et al.</i> , 2004
<i>Candida rugosa</i>	Esterificação	Butirato de butila	Heptano	24	50	Paula <i>et al.</i> , 2008
<i>Aspergillus oryzae</i>	Esterificação	Butirato de <i>iso</i> amila	Hexano	48	80	Aragão <i>et al.</i> , 2009
<i>Candida rugosa</i>	Esterificação	Oleato de butila	<i>iso</i> -octano	8	70	Hilal <i>et al.</i> , 2006
<i>Candida guilliermondii</i>	Esterificação	Oleato de metila	Hexano	72	86	Este trabalho
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Esterificação	Oleato de metila	Hexano	9	90,9	Este trabalho
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Esterificação	Ésteres metílicos do óleo de microalgas	Hexano	12	98,35	Este trabalho

2.3.4 Imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas é um procedimento que visa transformar a enzima que é naturalmente solúvel em meios aquosos, em um catalisador heterogêneo, ou seja, que não se dissolve no sistema reacional (BOM *et al.*, 2008; HILAL *et al.*, 2006).

Os métodos de imobilização visam formar uma interação fraca ou mesmo uma ligação covalente entre a enzima e o suporte. Esse processo apresenta uma série de vantagens, pois a enzima após imobilização adquire características diferenciadas das apresentadas em sua forma nativa como: mudanças nas propriedades cinéticas, aumento da estabilidade e insolubilidade (possibilitando fácil recuperação de um reator contínuo) (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; TAN *et al.*, 2010). Na Figura 5 é possível observar os diversos tipos de imobilização de enzimas.

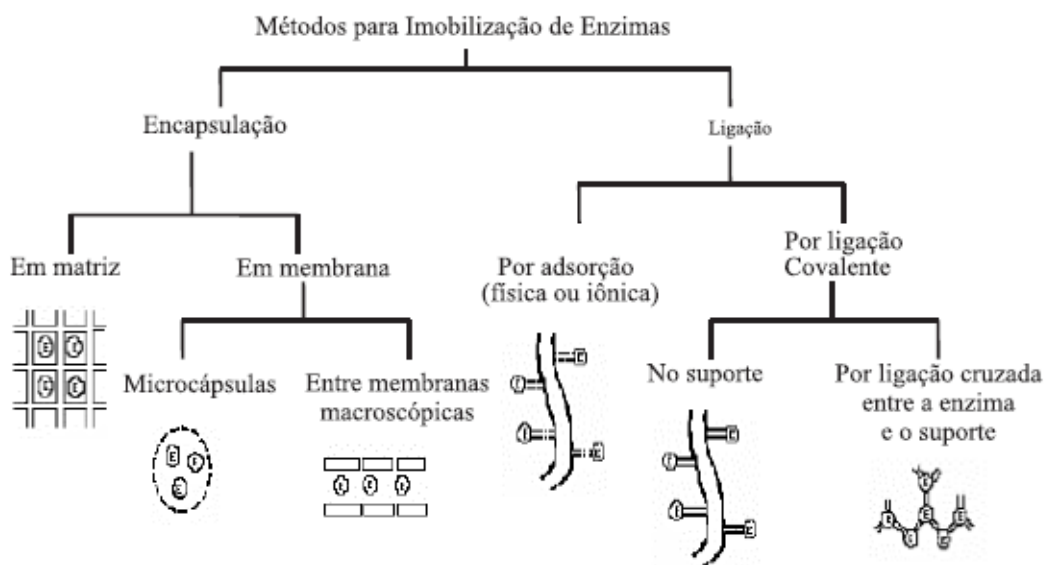


Figura 5. Métodos de imobilização de enzimas (Fonte: DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

A recuperação da atividade enzimática após a imobilização é ponto crucial para determinação do sucesso do processo. Para uma imobilização bem sucedida é necessário que a enzima não sofra alterações em sua conformação proteica e principalmente não sofra modificações em seu sítio

ativo. O processo como um todo é muito peculiar para cada enzima, necessitando sempre da adequação do tipo de suporte e de processo aplicado para a enzima em questão (BON *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2001).

3. DESAFIOS E OBJETIVOS

A revisão bibliográfica apresentou o uso de microalgas na produção de biodiesel e a aplicação de biocatalisadores para a produção de biocombustíveis. O uso de biocatalisadores em reações de esterificação e transesterificação é largamente estudada, porém a aplicação na síntese de biodiesel de microalgas ainda é muito limitada. Os biocatalisadores possuem vantagens como a possibilidade de reutilização (enzimas imobilizadas), e no caso das enzimas microbianas, sua produção pode ser em curto prazo. Industrialmente as enzimas são comumente obtidas através de fermentação submersa, e a fermentação no estado sólido apresenta características desejáveis para a produção de biocatalisadores, como por exemplo, a reutilização de resíduos agroindustriais e possibilidade de utilização do sólido fermentado diretamente em reações de síntese, o que faz necessário o aprimoramento destes processos.

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi sintetizar biodiesel de microalgas aplicando lipases fúngicas como catalisadores da reação de esterificação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir o objetivo geral, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Produzir biomassa da microalga *Scenedesmus* spp. através de cultivo heterotrófico;

- ✓ Extrair os ácidos graxos da biomassa de *Scenedesmus* spp. via processo de saponificação;
- ✓ Selecionar fungos produtores de lipases;
- ✓ Produzir lipases fúngicas por fermentação submersa e fermentação no estado sólido;
- ✓ Aplicar as lipases obtidas na reação de esterificação do oleato de metila;
- ✓ Otimizar a reação de síntese do oleato de metila, e comparar diferentes preparações enzimáticas;
- ✓ Aplicar as lipases obtidas na reação de esterificação dos ácidos graxos obtidos da biomassa de *Scenedesmus* spp.;
- ✓ Comparar diferentes preparações enzimáticas aplicadas na síntese do biodiesel de microalgas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Neste trabalho foram utilizados reagentes de grau analítico e grau de pureza requeridos nos experimentos, como o palmitato de p-nitrofenila (pNPP, Sigma, p.a) e ácido cis-9-octadecenóico (ácido oleico, Sigma).

4.2 MICRO-ORGANISMOS

Para a produção de lipases foram utilizadas cepas fúngicas endofíticas isoladas das folhas de mamona (*Ricinus communis* L.). Estas cepas foram gentilmente cedidas pelo grupo de pesquisa da professora M.Sc. Roseli Mello da Universidade Tuiuti do Paraná.

A levedura *Candida guilliermondii* foi identificada através de provas bioquímicas de assimilação de carbono e nitrogênio, e capacidade de fermentar alguns carboidratos, conforme descrito por Guimarães (2005). Os fungos *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium sumatrense* foram identificadas através de sequenciamento de DNA ribossomal, de acordo com metodologia descrita por Stringari (2009).

Para o cultivo heterotrófico uma mistura de microalgas foi coletada em um lago eutrófico no Passeio Público (Curitiba, PR – Brasil) e mantida em frascos Erlenmeyers de 2 L contendo 1,6 L de meio Chu (CHU, 1942), em pH 7,0. A temperatura foi mantida a 17 ± 2 °C e iluminação contínua (lâmpada branca fluorescente, 2500 lx). A aeração foi mantida por compressor de ar (fluxo de 5 L.min⁻¹). Após diversos cultivos foi observada a predominância de algas de *Scenedesmus* spp. e utilizado como inóculo para os cultivos posteriores.

4.3 CULTIVO HETEROTRÓFICO DE MICROALGAS *Scenedesmus* spp

4.3.1 Obtenção do inóculo

Um inóculo de 2 m³ do *Scenedesmus* spp. foi produzido em um tanque retangular (0,6 m de altura x 2,10 m de comprimento x 1,6 m de largura), utilizando o meio de cultura Chu (CHU, 1942), a pH 7,0 sob aeração constante. Este material foi utilizado para inocular um fotobiorreator compacto de 12 m³ (10 m² de área, 8 m de altura, 5 m de comprimento e 2 m de largura), que possui 3,5 km de tubo de PVC transparente em sua estrutura, sendo situado na área externa do laboratório e expostos ao tempo. O reator não foi iluminado durante a noite, a única fonte de carbono era o CO₂ contido no ar comprimido injetado no sistema através de uma coluna gasser–degasser de 10 m e 1,1 m de diâmetro. Uma semana após a inoculação, um volume de aproximadamente 2 L foi retirado e utilizado como inóculo para os experimentos de crescimento heterotrófico.

4.3.2 Otimização da produção de microalgas por cultivo heterotrófico

Visando a otimizar a produção da biomassa de *Scenedesmus* spp., a técnica de planejamento experimental foi aplicada. Três variáveis referentes a composição do meio de cultivo foram escolhidas: glucose (C₆H₁₂O₆, fonte de carbono), nitrato de sódio (NaNO₃, fonte de nitrogênio) e fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄). As concentrações em que estes compostos foram variados podem ser observadas na Tabela 5.

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 200 mL de meio Walne (ANDERSEN, 2005) com pH ajustado para 7,4 além dos compostos citados anteriormente. Cada frasco recebeu como inóculo 2x10⁸ células de *Scenedesmus* spp. obtidas conforme descrito no item

anterior, sendo os cultivos incubados em Shaker a 30 °C e 180 rpm por 11 dias. O teor final de biomassa em cada cultivo foi observado através de método gravimétrico.

Os níveis propostos para este planejamento fatorial foram baseados em ensaios previamente realizados.

Para este experimento foi assumido o valor de $p < 0,05$, que indica a probabilidade de o resultado obtido ser gerado ao acaso ou pela variável, neste caso, assume-se o nível de confiança de 95% como significativo. O delineamento experimental e as análises dos efeitos gerados pelas variáveis bem como seus valores de p foram calculados através do software Statistica 7.0.

Tabela 5. Níveis propostos para as variáveis do planejamento experimental para produção de biomassa de *Scenedesmus* spp.

Variável	-1	0	+1
Glucose	30	50	70
Nitrato de sódio	8	12	16
Fosfato	0,05	0,10	0,15

*Todas as variáveis são dadas em g.L⁻¹.

4.3.3 Extração dos ácidos graxos da biomassa de *Scenedesmus* spp.

Os ácidos graxos da biomassa úmida de *Scenedesmus* spp. foram extraídos por saponificação com posterior hidrólise ácida. A biomassa contendo cerca de 80% de umidade foi diretamente saponificada na presença de NaOH (0,25 g.g de biomassa⁻¹) e etanol (96,5% v/v – 10 mL.g de biomassa⁻¹), e agitada em Shaker durante uma hora a 180 rpm e 60 °C.

Após a saponificação, o ácido clorídrico (HCl) concentrado foi adicionado à solução alcoólica até pH 1,0, para liberação dos ácidos graxos livres. Desse meio os ácidos graxos foram obtidos através da extração líquido-líquido

utilizando hexano. O solvente foi posteriormente evaporado e os ácidos graxos isolados.

4.3.4 Identificação dos ácidos graxos de *Scenedesmus* spp.

Os ácidos graxos obtidos foram analisados por Cromatografia Gasosa (CG), sendo previamente esterificados com metanol. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso Varian modelo Saturn 1800 com um detector 4000 MS (íon) equipado com uma coluna capilar DB225 de 30 mm (comprimento) x 0,25 mm (diâmetro interno) x 0,25 µm (espessura do filme). A rampa de temperatura foi: injetor a 250 °C, forno inicialmente a 50 °C, mantido por 2 min, aquecido a 90 °C (20 °C.min⁻¹ e então mantido por 1 min) e depois a 280 °C (5°C.min⁻¹ e depois mantido por 2 min). Espectro de ionização eletrônica foi obtido a 70 eV e 200 °C. O volume de injeção foi 1 µL com uma razão de 1:10. Análises depois da corrida foram feitas com o Saturn Workstation 5.1. Os ácidos graxos foram identificados comparando o tempo de retenção com os padrões. O padrão de ácidos graxos usado (Sigma-Supelco) foi uma mistura chamada FAME (Fatty Acid Methyl Esther).

4.4 SELEÇÃO DE CEPAS MICROBIANAS PARA PRODUÇÃO DO BIOCATALISADOR

As cepas com atividade lipolítica foram selecionadas em placa de Petri em meio contendo óleo de oliva 1% como única fonte de carbono e rodamina B 0,01%. As cepas foram inoculadas por picada e incubadas a 28 °C por 72 h. A atividade lipolítica foi revelada através da observação de halo alaranjado fluorescente quando observado no transiluminador ultravioleta a 350 nm (LORENTZ, 2005).

4.5 PREPARO DO INÓCULO

O inóculo da cepa de levedura *Candida guilliermondii* foi obtido cultivando a levedura em meio contendo levedo de cerveja (10 g.L^{-1}) e glicerina (5 g.L^{-1}) por 4 dias em Shaker a 30°C . A concentração de células foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

As cepas fúngicas foram incubadas em meio BDA (ágar batata dextrose) por 7 dias em estufa a 30°C . Após crescimento, foi adicionada água destilada estéril às culturas para ressuspensão dos esporos. A concentração de esporos foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

4.6 PRODUÇÃO DE LIPASES DA LEVEDURA *Candida guilliermondii*

4.6.1 Otimização da produção de lipases de *Candida guilliermondii* utilizando planejamento experimental 2^{6-3}

A fermentação foi conduzida em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 150 mL de meio de fermentativo. Todos os meios foram solubilizados em tampão fosfato 25 mM e pH 6,5. As fermentações foram conduzidas em Shaker a 30°C e 180 rpm por 72 h.

Para otimizar a produção foi realizado um planejamento experimental 2^{6-3} , empregando as variáveis da composição do meio de cultivo: Tween 80, glicerol, óleo de soja, sulfato de manganês, levedo de cerveja e sulfato de amônio. Todos os meios foram esterilizados em autoclave, e após atingir temperatura ambiente foram acrescidos de 10^9 células do inóculo. Os níveis das variáveis podem ser observados na Tabela 6. A variável resposta escolhida foi a atividade enzimática em U.mL^{-1} de cada meio fermentado. As análises estatísticas foram realizadas pelo software Statistica 7.0.

Tabela 6. Níveis propostos para as variáveis do planejamento experimental para a produção de lipases por *Candida guilliermondii*.

Variável	-1	0	+1
Tween 80	10	30	50
Glicerol	10	30	50
Óleo de soja	30	60	90
Sulfato de Manganês	0,1	0,2	0,3
Levedo de cerveja	10	30	50
Sulfato de amônio	10	30	50

*Todas as variáveis são dadas em g.L⁻¹.

4.6.2 Produção da enzima em biorreator

Após verificar a capacidade da levedura em secretar enzimas lipolíticas em frascos agitados, a fermentação em maior escala foi testada. O meio fermentativo proposto como ponto central no item anterior foi utilizado, sendo acondicionado em biorreator com capacidade de 20 L um volume de 14 L de meio fermentativo. O sistema foi mantido a temperatura de 30 °C, com aeração conferida por compressor de ar com fluxo de 2,3 L de ar.min⁻¹.

4.6.3 Purificação parcial da enzima com sulfato de amônio

Após a fermentação, a enzima foi parcialmente purificada por precipitação com sulfato de amônio sólido $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$. A precipitação foi realizada em banho de gelo, nas faixas de saturação de 50, 60, 70 e 80%. Nas faixas de 50 a 70% atividades lipolíticas irrelevantes foram recuperadas, sendo estas porções descartadas e a porção de saturação a 80% foi a utilizada. O precipitado foi ressuspenso no mínimo de água destilada e dialisado em água destilada por 48 h a 4 °C. Esta temperatura foi selecionada para evitar a desnaturação da enzima e contaminação do material. O dialisado foi liofilizado para aplicação nas reações de esterificação.

4.7 PRODUÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS DE *Penicillium sumatrense* e *Aspergillus fumigatus*

4.7.1 Produção de lipases fúngicas por FES

A semente de girassol foi escolhida como substrato para a fermentação no estado sólido. O substrato foi triturado e tamisado, utilizando para a FES a fração de granulometria entre 0,8 e 1,4 mm. Uma solução nutriente composta por tampão fosfato 50 mM e pH 6,5, Tween 80 (10 g.L⁻¹), levedo de cerveja (10 g.L⁻¹) e óleo de soja (10 g.L⁻¹) foi utilizada para manter a umidade da fermentação na proporção de 65%. Em Erlenmeyers de 1 L foram acondicionados 100 g de substrato sólido e a solução nutriente. Após esterilização foram inoculados 10⁷ esporos por grama de substrato sólido. A fermentação foi incubada em estufa a 30 °C por 72 h.

4.7.2 Recuperação da enzima do sólido fermentado

Para os ensaios de síntese foram testadas algumas condições de obtenção da enzima após a fermentação.

Nos ensaios onde o material fermentado foi adicionado diretamente ao meio reacional, o sólido fermentado obtido por FES foi seco em estufa de circulação de ar por 48 h a 30 °C.

O sólido fermentado também passou pelo processo de delipidação, a fim de avaliar a interferência do material graxo presente no sólido fermentado nas reações de síntese. Para delipidação, o sólido fermentado após secagem foi submetido à extração do material graxo através da adição de 10 mL de hexano para cada grama de sólido fermentado seco e incubados em Shaker a 180 rpm e temperatura ambiente por 1 h.

Para obtenção do extrato bruto enzimático foram adicionados ao meio fermentado 5 mL de solução de NaCl 1% para cada grama de substrato sólido, sendo este mantido em agitação por 1 h a 100 rpm. Esta solução foi utilizada para solubilizar mais facilmente a enzima. Filtrou-se em tecido com pressão manual para obtenção do extrato bruto, que foi centrifugado a 2000 rpm por 8 min, desprezando-se o precipitado.

Após recuperação dos meios fermentados, o extrato bruto foi submetido ao processo de liofilização, com e sem a adição de sorbitol (1%), para concentração da enzima e eliminação da água das amostras. A adição de sorbitol nesta etapa teve a finalidade de avaliar se um poliol aumentaria a estabilidade da enzima.

4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.8.1 Método titulométrico

A dosagem da atividade enzimática foi determinada pelo método titulométrico descrito por Franken (2007), com adaptações. Para as dosagens foi preparada uma emulsão contendo óleo de oliva (7,15% m/v) emulsificada em goma arábica (7% m/v) em tampão fosfato 2,5 mM e pH 7,0.

O ensaio foi realizado em Erlenmeyers de 125 mL, adicionando-se 19 mL da emulsão e 1 mL do extrato bruto. As amostras foram incubadas em Shaker, sob agitação, por 15 min a 30 °C. A reação foi paralisada adicionando-se 15 mL de solução de etanol/acetona (1:1 v/v). Os ácidos graxos liberados foram titulados em solução de NaOH (0,05 N) até pH 11.

Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 mM de ácido graxo por minuto nas condições descritas acima, sendo o resultado expresso em unidades totais por fermentação.

4.8.2 Método de hidrólise do pNPP

A atividade enzimática do meio fermentado foi determinada pelo método de hidrólise do pNPP (palmitato de p-nitrofenila), descrito por Ghori *et al.* (2011), com adaptações. 100 µL do meio fermentado foram incubados com 800 µL de solução de PVA (álcool polivinílico) 0,25% em tampão fosfato pH 6,5 e 100 µL de solução de pNPP 8 mM em isopropanol. Após incubação a 30 °C a reação foi paralisada com 500 µL de HCl 3 M. O meio reacional foi centrifugado e 500 µL do sobrenadante foram adicionados a 1 mL de NaOH 2 M. A leitura foi realizada a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1 µmol de p-nitrofenol por minuto.

4.9 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA

O processo de imobilização foi empregado com a finalidade de aumentar a estabilidade das enzimas, bem como possibilitar sua reutilização.

A imobilização foi conduzida conforme descrito por Paula *et al.* (2008) e Oliveira *et al.* (2012b). Os suportes escolhidos foram a agarose e a sílica gel 60G.

Para a imobilização por ligação covalente os suportes foram ativados com glutaraldeído. Cada grama de suporte foi acrescido de 10 mL de solução de glutaraldeído 2,5% (v/v) e agitado por 1 h. Após tratamento, os suportes foram lavados exaustivamente com água destilada e tampão fosfato 25 mM pH 6,5. Os suportes destinados à adsorção foram apenas lavados com tampão, para retirada de eventuais resíduos. Os suportes foram secos em estufa a 60 °C.

Para cada grama de suporte foi adicionado 450 U da enzima liofilizada e 10 mL de hexano. O sistema foi incubado a 30 °C até completa evaporação do hexano. Após, o material foi lavado com hexano para remoção das enzimas não imobilizadas e filtrado a vácuo.

4.10 ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO PELA LIPASE DE *Candida guilliermondii*

4.10.1 Escolha do melhor solvente e razão molar para a síntese do oleato de etila e metila

O ácido oleico foi o ácido graxo escolhido para as reações de esterificação, de modo a simular a reação de produção de biodiesel. Durante o desenvolvimento de um novo catalisador, o uso de substrato contendo apenas um tipo ácido graxo permite a comparação de resultados de diferentes

sínteses, ao contrário do uso de uma matriz de ácidos graxos distinta que, eventualmente, pode variar em função do lote de matéria prima utilizado.

A síntese do oleato de etila e metila foi realizada em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo um volume reacional de 10 mL. Em cada frasco foi adicionado o equivalente a 2000 Unidades de enzima liofilizada, 50 mM de ácido oleico, 200 mM de etanol ou metanol e 10 mL de solvente orgânico. Foram testados três solventes orgânicos para a realização da síntese, sendo estes: hexano, ciclohexano e ciclohexanona. As reações foram incubadas em Shaker a 30 °C e 180 rpm por 72 h.

Após observar o melhor solvente para reação de esterificação do ácido oleico, este foi utilizado para avaliar a melhor razão molar. Foram utilizadas as mesmas condições do ensaio anterior, apenas variando a razão molar entre o ácido oleico e os alcoóis etanol e metanol. As razões molares ácido: álcool testadas foram: 1:6, 1:9 e 1:12 para ambos os alcoóis. As reações foram analisadas em triplicata.

4.10.2 Síntese do oleato de metila com enzimas imobilizadas

A síntese do oleato de metila foi realizada em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo um volume reacional de 10 mL. Em cada frasco foi adicionado o equivalente a 700 U da enzima imobilizada em sílica e agarose por ligação covalente e por adsorção, e também um ensaio foi conduzido nas mesmas condições e com a mesma quantidade da enzima livre. O meio reacional era composto por ácido oleico e metanol na razão molar 1:9 (50 mM de ácido oleico e 450 mM de metanol). As reações foram incubadas em Shaker a 30 °C e 180 rpm por 72 h e analisadas em triplicata.

4.10.3 Reutilização das enzimas imobilizadas

Após utilização da enzima, estas foram lavadas com hexano, filtradas e secas a 30 °C, para avaliar a possibilidade de reutilização das enzimas imobilizadas. Foram realizados 3 reutilizações, desta forma totalizando 4 processos reacionais para cada preparação avaliada.

4.11 ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO PELAS LIPASES DE *Penicillium sumatrense* e *Aspergillus fumigatus*

4.11.1 Reação de esterificação com adição direta do sólido fermentado

O estudo da reação de síntese do oleato de metila permite avaliar a formação do produto pelas lipases em função do tempo. A síntese do oleato de metila foi realizada em triplicata, sendo conduzidas em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo um volume reacional de 10 mL. Em cada frasco foram adicionados o sólido fermentado numa proporção equivalente a 60 U, 50 mM de ácido oleico, 450 mM de metanol e 10 mL de hexano. As reações foram incubadas em Shaker a 30 °C e 180 rpm, e acompanhadas por 24 h.

4.11.2 Escolha do melhor solvente e razão molar para a síntese do oleato de metila

Os ensaios foram realizados utilizando o sólido fermentado (60 U) nas mesmas condições descritas no item 4.11.1, apenas variando a razão molar (ácido oleico: metanol) em 1:4, 1:6, 1:9 e 1:12. As reações foram incubadas por 24 h.

Determinada a melhor razão molar para as enzimas, foi avaliado o melhor solvente para catálise. Foram testados os solventes hexano, heptano, tolueno e clorofórmio.

4.11.3 Reutilização do sólido fermentado

Após as reações, o sólido fermentado foi lavado em hexano e seco a 30 °C. As amostras foram submetidas a 15 ciclos sucessivos e a atividade residual foi observada.

4.11.4 Reações com outras preparações enzimáticas

Os ensaios de esterificação do ácido oleico foram realizados conforme descritos no item 4.11.1, e com o solvente e a razão molar otimizados para o sólido fermentado. Todos os sistemas reacionais receberam o equivalente a 60 U das diferentes preparações enzimáticas: as enzimas na forma imobilizada, o extrato bruto liofilizado e o extrato bruto liofilizado na presença de sorbitol 1%. As reações foram incubadas em Shaker a 30 °C e 180 rpm e acompanhadas por 12 h.

4.12 ESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MICROALGAS

4.12.1 Reação de esterificação com adição direta do sólido fermentado de *Penicillium sumatrense* e *Aspergillus fumigatus*

A esterificação dos ácidos graxos de microalgas foi realizada em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo um volume reacional de 10 mL. Em cada

frasco foram adicionados o sólido fermentado numa proporção equivalente a 60 U, 50 mM de ácido graxo, 450 mM de metanol e 10 mL de hexano. As reações foram incubadas em Shaker a 30 °C e 180 rpm, e acompanhadas por 12 h. A mesma reação foi conduzida para os sólidos fermentados delipidados obtidos conforme especificado no item 4.7.2. As reações foram analisadas em triplicata.

4.13 ANÁLISE DOS ÉSTERES OBTIDOS

4.13.1 Método de Lowry-Tinsley

Para a determinação da conversão de ácidos graxos em ésteres foi utilizado um método espectrométrico descrito por Lowry-Tinsley (1976). Este método baseia-se na ligação entre os ácidos graxos livres e os íons Cobre II em meio orgânico, possibilitando a avaliação do percentual de ácidos graxos convertidos a ésteres. 0,2 mL do meio reacional são adicionados a 2,4 mL de tolueno e 0,5 mL da solução de piridina e acetato de cobre (5%). As reações foram agitadas em vórtex por 30 s e a fase orgânica lida em espectrofotômetro em 715 nm.

4.13.2 Cromatografia gasosa

As soluções dos produtos das reações de esterificação (1 mg/mL) foram analisados por um Cromatógrafo gasoso Shimadzu CG-2010, equipado com uma coluna (30m x 0,25mm x 0,25 µm) RTx-5MS CB (5% fenil/95% dimetilpolisiloxano) acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu CGMS-QP2010. O gás de arraste utilizado foi hélio, num fluxo de 1,02 mL/min. A rampa de aquecimento começou a 60 °C por 1 min seguido por um aquecimento até 250 °C a 3 °C/min. O espectrômetro de massas foi operado

no modo de Impacto de Elétrons (70 eV) com a faixa de detecção entre 40 e 350 m/z. A interface e a fonte de elétrons estavam a 250 °C.

4.13.3 RMN ^1H

O oleato de metila também foi caracterizado por RMN de ^1H . Os espectros de RMN ^1H foram adquiridos em CDCl_3 em um espectrômetro Bruker Avance DPX 200, a 200 MHz. Todos os deslocamentos químicos (δ) são dados em ppm relativos ao sinal do TMS a 0,00 ppm, como referência interna, e todos as constantes de acoplamento (J) estão em Hz.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CULTIVO HETEROTRÓFICO DE MICROALGAS *Scenedesmus* spp.

5.1.1 Otimização da produção de microalgas por cultivo heterotrófico

O planejamento experimental foi aplicado com a finalidade de se obter o melhor meio de cultivo para a produção de biomassa microalgal em um pequeno número de experimentos. Os resultados obtidos em cada ensaio podem ser observados na Tabela 7.

Em todos os tratamentos propostos pode ser observada a secreção de lipases. A estimativa dos efeitos e valores de p para cada variável podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 7. Matriz do planejamento experimental e resultados obtidos para a produção de biomassa de *Scenedesmus* spp.

Experimento	Glucose	Nitrato (NaNO ₃)	Fosfato (Na ₂ HPO ₄)	Biomassa (g.L ⁻¹)
1	-1	-1	0	9,43
2	1	-1	0	22,96
3	-1	1	0	8,63
4	1	1	0	18,87
5	-1	0	-1	10,87
6	1	0	-1	21,50
7	-1	0	1	8,87
8	1	0	1	19,33
9	0	-1	-1	15,07
10	0	1	-1	14,73
11	0	-1	1	20,33
12	0	1	1	18,50
13	0	0	0	18,93
14	0	0	0	20,90
15	0	0	0	19,53

Das três variáveis testadas, apenas para a variável glucose foi observada significância estatística a um nível de confiança de $p < 0,05$, apresentando efeito de 11,22, ou seja, quando a concentração desta variável foi elevada do nível mínimo para o nível máximo houve um ganho de 11,22 g.L⁻¹ de biomassa.

Tabela 8. Estimativa do efeito das variáveis para a produção de biomassa de *Scenedesmus* spp.

Variável	Efeito ^a	Valor de p^b
Glucose	11,22	0,000104*
Nitrato de sódio	-1,77	0,37
Fosfato de sódio	1,22	0,54

^aEfeito causado pela variável independente na produção de biomassa (variável resposta) quando a concentração da variável é elevada do nível mínimo (-1) para o nível máximo (+1).

^b Nível de confiança de 95%

As outras duas variáveis apresentaram significância menor, porém a variável nitrato de sódio apresentou efeito negativo (-1,77 g.L⁻¹), o que resultou na determinação de suas concentrações ideais para a melhor produção de biomassa, o que pode ser observado nos gráficos de superfície de resposta na Figura 6.

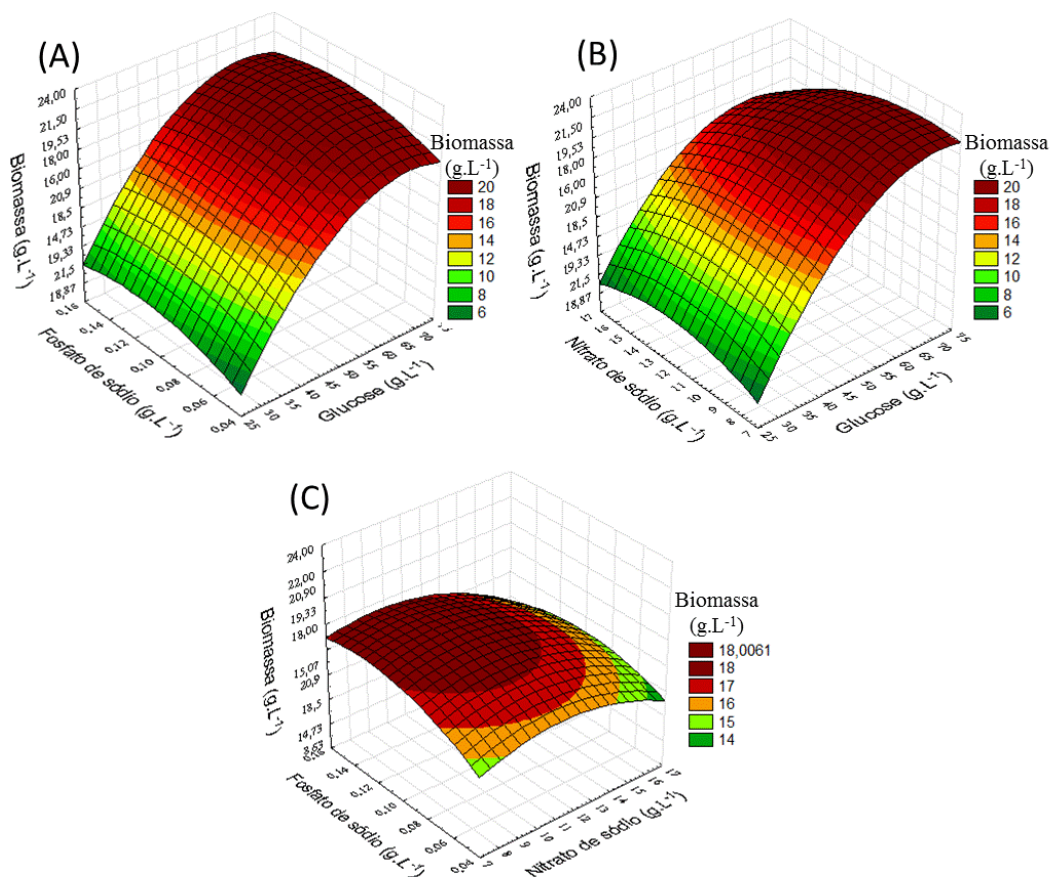


Figura 6. Gráficos de superfícies de resposta que apresentam a interação entre as concentrações de (A) glucose e fosfato de sódio; (B) glucose e nitrato de sódio e (C) fosfato de sódio e nitrato de sódio na produção de biomassa.

O cultivo heterotrófico tem apresentado resultados expressivos quando comparado ao cultivo autotrófico na produção de biomassa de microalgas. Azma *et al.* (2011) utilizaram o planejamento experimental para otimizar a produção de biomassa da microalga *Tetraselmis suecica*, obtendo cerca de 28 g.L^{-1} , resultado semelhantes aos obtidos neste experimento. Este resultado é bastante promissor quando comparado ao cultivo autotrófico, onde a concentração de biomassa gira em torno de 1 g.L^{-1} , fato que justifica a utilização de uma fonte de carbono orgânica, como a glucose.

5.1.2 Obtenção do óleo de microalgas

Os ácidos graxos da biomassa da microalga *Scenedesmus* spp. obtida no experimento 2 do item anterior foram obtidos via saponificação. O rendimento da extração foi de $5,57 \pm 0,87$ % de ácidos graxos. O perfil dos ácidos graxos foi obtido através de cromatografia gasosa, e pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 9. Perfil dos ácidos graxos obtidos da microalga *Scenedesmus* spp. através de cultivo heterotrófico.

Ácidos graxos	%
C16:0 Palmítico	24,39
C18:0 Esteárico	3,94
C16:1 Palmitoleico	8,22
C18:1n9c Oleico	29,40
C18:2n6 Linoleico	19,85
C18:3n6 Linolênico	<0,01
C20:5n3 Eicosapentaenoico (EPA)	<0,01
C22:6n3 Docosaexaenoico (DHA)	1,56
Outros	12,62
Saturados	35,82
Monoinsaturados	42,77
Poli-insaturados	21,41
Trans-Isômeros Totais	<0,01

Analisando os dados da Tabela 9, verifica-se que os ácidos graxos monoinsaturados apresentam predominância na composição lipídica de *Scenedesmus* spp. Os ácidos graxos oleico e palmítico foram os de maior produção pela microalga, resultado também obtido por Sydney *et al.* (2011) que destacam que este perfil lipídico se assemelha aos de óleos vegetais como o de soja e palma, apresentando boa qualidade para a produção de biodiesel.

Lin e Lin (2011) observaram que na obtenção do óleo de microalgas de *Scenedesmus rubescens*, os ácidos graxos da série C18 foram predominantes, representando mais da metade do conteúdo lipídico total, como neste caso, onde a composição C18 representa 53,2% dos ácidos graxos.

Um fator determinante na produção de óleo e no perfil lipídico obtido é a composição do meio de cultivo empregada. Alguns autores relatam que altas concentrações de nitrogênio podem levar a diminuição do conteúdo lipídico da biomassa, porém pode resultar num aumento do teor das séries C16 e C18 (Tan e Lin, 2011). Quando Lin e Lin (2011) aplicaram o nitrato de sódio em altas concentrações no meio de cultivo obtiveram um total de 87% de ácidos graxos das séries C16 e C18, enquanto que neste trabalho para a mesma fonte de carbono foram obtidos 86% de ácidos graxos destas séries.

5.2 SELEÇÃO DE CEPAS MICROBIANAS PARA PRODUÇÃO DO BIOCATALISADOR

Primeiramente, as cepas fúngicas foram avaliadas quanto à sua capacidade de secretar enzimas lipolíticas em placa de Petri, sendo adicionado ao meio apenas óleo de oliva como fonte de carbono, e o corante rodamina B, que produz fluorescência alaranjada na presença de luz UV, quando o teste é positivo para produção de enzimas lipolíticas, como pode ser observado na Figura 7.

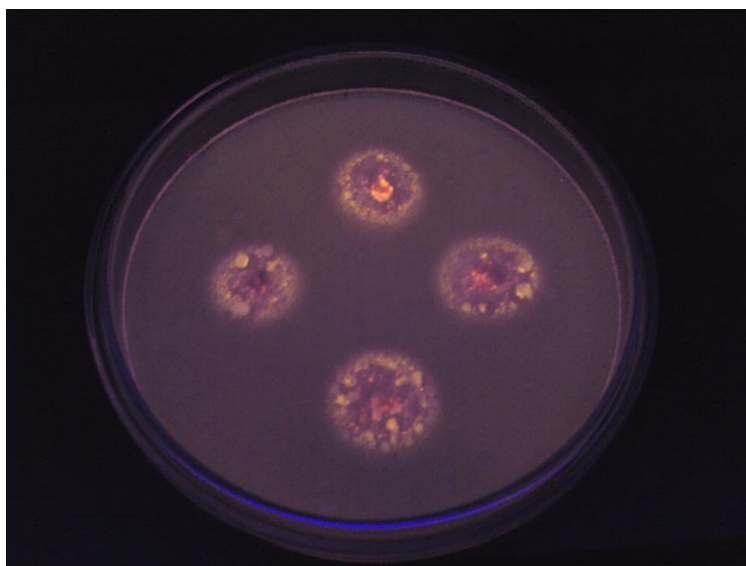


Figura 7. Halo indicativo da produção de enzimas lipolíticas em meio contendo óleo de oliva como fonte de carbono e o corante rodamina B.

Para a seleção de micro-organismos produtores de lipase foram investigadas 20 cepas endofíticas fornecidas pelo grupo de pesquisa da professora Roseli Mello, da Universidade Tuiuti do Paraná. Os resultados mostraram que das cepas analisadas, 3 foram selecionadas para os testes futuros, sendo estas identificadas como a levedura *Candida guilliermondii*, e os fungos *Penicillium sumatrense* e *Aspergillus fumigatus*.

5.3 PRODUÇÃO DE LIPASES pela levedura *Candida guilliermondii*

5.3.1 Otimização da produção de lipases de *Candida guilliermondii* utilizando planejamento experimental 2⁶⁻³

O planejamento experimental foi aplicado na intenção de se obter o melhor meio fermentativo para a produção de lipases em um pequeno número de experimentos. Os resultados obtidos em cada ensaio podem ser observados na Tabela 10.

Em todos os tratamentos propostos pode ser observada a secreção de lipases. A estimativa dos efeitos e valores de p para cada variável podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 10. Matriz do planejamento experimental e resultados obtidos para a produção de lipases por *Candida guilliermondii*.

Exp.	Tween 80	Glicerol	Óleo	Mn	Levedo	Sulfato amônio	Atividade (U.mL ⁻¹)
1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	8,69
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1	13,58
3	-1	+1	-1	-1	+1	-1	14,97
4	+1	+1	-1	+1	-1	-1	22,15
5	-1	-1	+1	+1	-1	-1	23,56
6	+1	-1	+1	-1	+1	-1	25,11
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	10,84
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	21,31
9	0	0	0	0	0	0	18,76
10	0	0	0	0	0	0	19,45
11	0	0	0	0	0	0	19,03

Tabela 11. Estimativa dos efeitos das variáveis para a produção de lipases por *Candida guilliermondii*.

Variáveis	Efeito	Valor de <i>p</i>
Tween 80	6,02	0,007*
Glicerol	-0,42	0,74
Óleo de soja	5,36	0,01*
Sulfato de manganês	2,80	0,08
Levedo de cerveja	-0,01	0,99
Sulfato de amônio	-7,84	0,003*

*significativo em nível de 95% de confiança, desvio padrão = $\pm 0,12$

Na composição do meio de cultivo foram escolhidos substratos de baixo custo, como os resíduos glicerol e levedo de cerveja, além do óleo de soja, que representa uma diminuição nos custos de produção de lipases, que geralmente requerem óleo de oliva como indutor.

As variáveis Tween 80, óleo de soja e sulfato de amônio foram as que mais apresentaram efeito sobre a secreção de lipases, num nível de confiança de 95%. Os gráficos de superfície de resposta para estas variáveis podem ser observados na Figura 8.

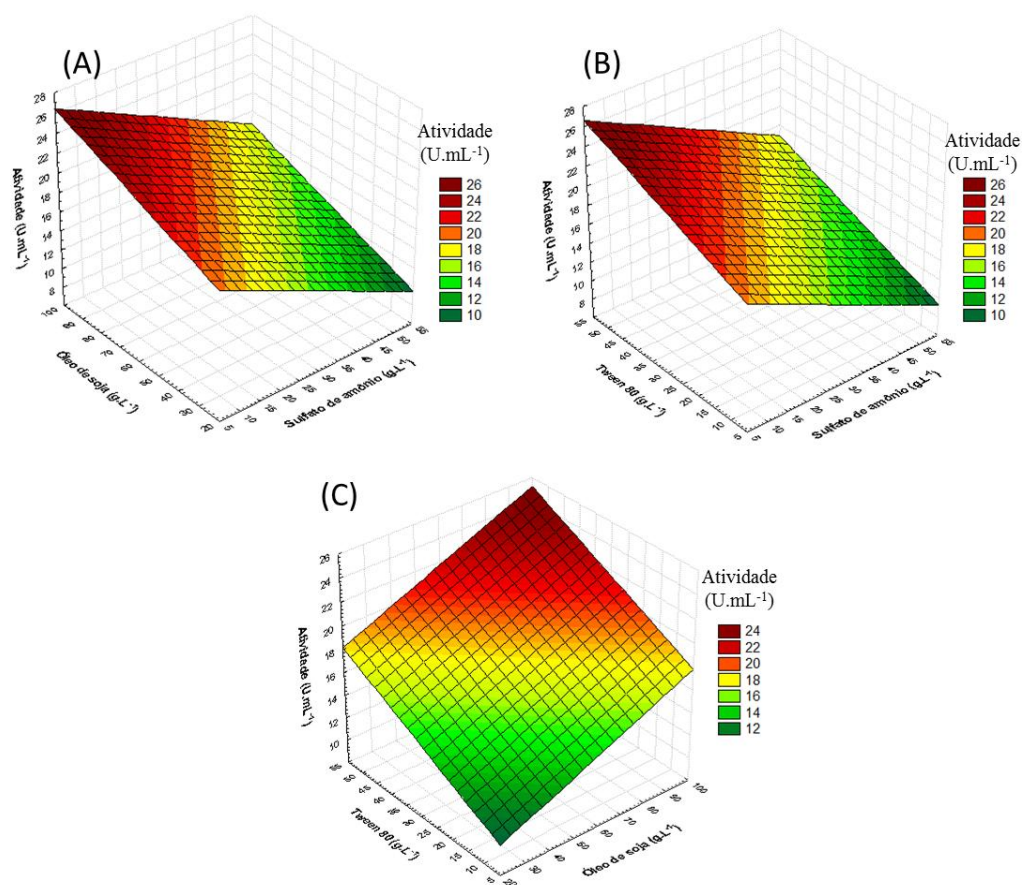


Figura 8. Gráficos de superfícies de resposta que apresentam a interação entre as concentrações de (A) óleo de oliva e sulfato de amônio; (B) Tween 80 e sulfato de amônio e (C) Tween 80 e óleo de soja na produção de lipases por *Candida guilliermondii*.

O Tween 80 e o óleo de soja têm como função induzir a secreção de lipases. As lipases são enzimas de caráter indutivo, que na presença de um indutor são secretadas mais facilmente pela cepa microbiana (DAMASO *et al.*, 2008). Estas variáveis apresentaram um efeito bastante positivo na secreção

da enzima, pois quando o nível de Tween 80 foi aumentado do nível -1 para o + 1, a produção da enzima aumentou em $6,02 \pm 0,12 \text{ U.mL}^{-1}$ e no caso do óleo o aumento foi de $5,36 \pm 0,12 \text{ U.mL}^{-1}$. Salihu *et al.* (2011) otimizou a produção de lipases de uma cepa de *Candida cylindracea* através de planejamento experimental, e a variável de maior importância foi o Tween 80. Este composto possui uma característica interessante para a produção de lipases, pois em sua estrutura existe uma grande porção lipofílica e ao mesmo tempo este é solúvel em água devido à sua natureza tensoativa, que o faz solubilizar no meio tornando-se mais disponível as células dos micro-organismos.

A variável sulfato de amônio, quando aumentada de nível, gerou um decréscimo na secreção de lipases de $-7,84 \pm 0,12 \text{ U.mL}^{-1}$, pois o nível máximo encontra-se muito elevado para as fontes de nitrogênio comumente usadas para a produção de lipases. Kamini *et al.* (2000) avaliaram diversas fontes de nitrogênio nas concentrações de 5 g.L^{-1} , enquanto que na otimização realizada por Salihu *et al.* (2011) as concentrações puderam chegar até cerca de 20 g.L^{-1} . Lima *et al.* (2003) avaliaram a melhor fonte de nitrogênio para a produção de lipases fúngicas e observaram que a razão molar carbono/nitrogênio ideal era a de 5:1, e na razão molar 1:1 não pôde ser observada a secreção de lipases.

5.3.2 Produção da enzima em biorreator

Após verificar que a levedura foi capaz de secretar lipases em frascos Erlenmeyers, a produção em maior escala foi conduzida a fim de se observar a possibilidade da produção deste biocatalisador em uma escala maior, simulando as dificuldades de produção em escala piloto. A atividade enzimática obtida nesta etapa foi de $18,0 \pm 0,7 \text{ U.mL}^{-1}$, atividade bastante semelhante a obtida em frascos agitados, comprovando que a produção da enzima em maior escala pode ser viável.

O preço do biocatalisador é um dos fatores limitantes para sua utilização em síntese de ésteres, pois o de catalisadores químicos é muito mais acessível. Para baratear o custo da produção de enzimas alguns procedimentos podem ser adotados, como a utilização de resíduos e

substratos de baixo custo para sua produção (SALIHU *et al.*, 2012). Neste trabalho, foram utilizadas fontes de nutrientes baratas como o glicerol, que é um resíduo da produção do biodiesel, o resíduo levedo de cerveja e o sulfato de amônio, que são materiais de baixo custo. Outro substrato que foi substituído do meio foi o óleo de oliva que é comumente usado como indutor para a secreção de lipases, sendo este trocado por óleo de soja, que além de apresentar baixo custo, tem grande disponibilidade no país, o que se torna relevante para uma produção em grande escala.

Damasso *et al.* (2008) produziu lipases fúngicas por fermentação em estado sólido (FES) utilizando como indutor, resíduos do processamento do óleo milho. Um dos resíduos apresentou uma produção 30% maior do que na presença do óleo de oliva, demonstrando que a utilização de resíduos além de baratear o preço do meio de cultivo pode também gerar resultados superiores ao de substratos comuns.

Outro ponto que deve ser avaliado é a produção do biocatalisador em maior escala, a fim de suprir uma grande demanda. A produção em biorreatores ainda é pouco explorada, e este é um passo de grande importância para futuras produções industriais (SHARMA *et al.*, 2001). Micro-organismos são muito sensíveis ao ambiente a que são expostos, e simplesmente aumentar o volume de um mesmo meio fermentativo não significa o sucesso de uma produção em larga escala. Vários fatores devem ser adequados como aeração e agitação ideal. Neste experimento observou-se que o ambiente fornecido para o micro-organismo foi tão satisfatório quanto o de frascos agitados, pois os resultados foram muito similares.

Bussamara *et al.* (2010) produziram lipases de leveduras em biorreator com o mesmo volume deste trabalho, porém com controle de pH e grande agitação. Eles obtiveram cerca de 1200 U de lipase por litro de meio fermentado, cerca de 7% da produção observada neste estudo, onde foram obtidos o equivalente a 18000 U.

Iftikhar *et al.* (2010) produziu lipases em biorreator de bancada, com volume de 3 L de meio fermentado, obtendo 9 e 40 U.mL⁻¹ para uma cepa selvagem e uma mutante, respectivamente. Eles verificaram que a produção em biorreatores foi maior do que a em frascos agitados, sendo um dos motivos para este resultado a automação do controle do processo, como no controle do

pH, o que em maior escala se torna mais acessível e com menor custo do que em um processo laboratorial.

5.4 PRODUÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS DE *Penicillium sumatrense* e *Aspergillus fumigatus*

A fermentação no estado sólido e foi empregada para obtenção de lipases de *P. sumatrense* e *A. fumigatus*. A produção da enzima em cada meio pode ser observada na Figura 9.

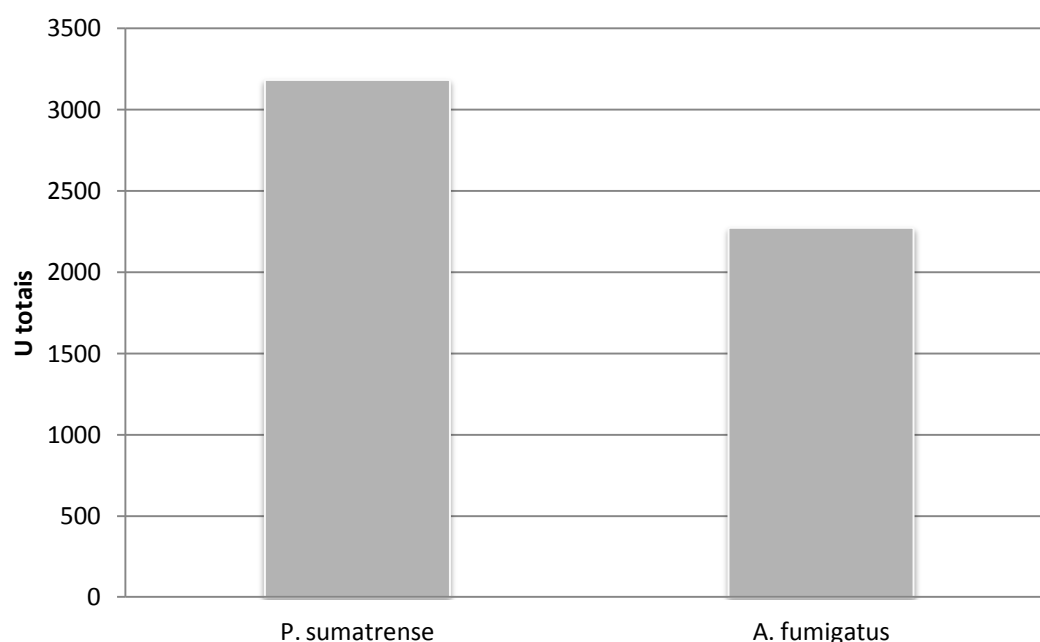


Figura 9. Produção de lipases através de fermentação no estado sólido pelos fungos *Penicillium sumatrense* e *Aspergillus fumigatus*.

A cepa de *P. sumatrense* apresentou produção de 3183 U em 100 g de sólido fermentado, enquanto que *A. fumigatus* produziu 2273 U, nas mesmas condições de cultivo.

A fermentação submersa é um processo que favorece o desenvolvimento de micro-organismos unicelulares, como as leveduras, e

geralmente não é muito adequado aos fungos, devido ao seu crescimento micelial, e por este motivo a FES foi o processo escolhido para obtenção das lipases fúngicas (OLIVEIRA *et al.*, 2012a; SHARMA *et al.*, 2001).

A fermentação no estado sólido apresenta uma série de vantagens para o cultivo de fungos, pois além de fornecer os nutrientes para o desenvolvimento microbiano ainda apresenta um ambiente ideal para o crescimento. O ambiente sólido e úmido favorece o crescimento micelial, pois os fungos geralmente necessitam de uma superfície a qual possam se aderir (BARRIOS-GONZÁLES, 2012).

5.5 ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO PELA LIPASE DE *Candida guilliermondii*

5.5.1 Escolha do melhor solvente e razão molar

A esterificação do ácido oleico foi avaliada quanto ao melhor solvente para a reação e a melhor razão molar entre ácido e álcool.

Foram utilizados três solventes, o hexano (log P 3,5), ciclohexano (log P 3,2) e ciclohexanona (log P 0,81), e os resultados variaram entre os meios reacionais e álcoois usados, como pode ser observado na Figura 10.

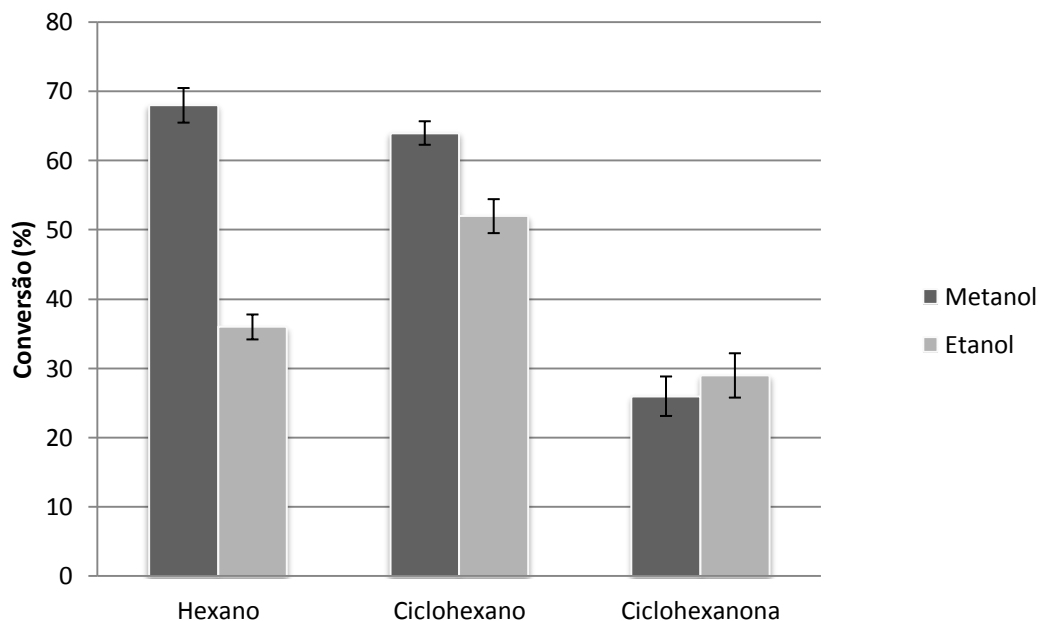


Figura 10. Efeito do solvente na esterificação do ácido oleico com etanol e metanol catalisada pela lipase de *Candida guilliermondii*. Condições: 2000U, razão molar 1:4, 72 horas de reação a 30 °C e 180 rpm.

A ação dos solventes orgânicos na catálise enzimática dá-se essencialmente em três níveis: a) por interação direta do solvente com a enzima, alterando a sua conformação nativa por ruptura das ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, b) por interação com substratos e produtos da reação, afetando a sua solubilidade e difusão ou participando diretamente na reação, c) por interação com a camada de água de hidratação da enzima e sua remoção (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2009).

A escolha do solvente orgânico a ser utilizado em catálise faz-se de acordo com uma classificação proposta por Laane *et al.* (1987), a qual se baseia no coeficiente de partição ($\log P$), para o sistema bifásico octanol/água.

Geralmente, a atividade enzimática é baixa em solventes relativamente hidrofílicos ($\log P < 2$), pois estes podem desnaturar as enzimas por penetrarem nos núcleos hidrofóbicos das proteínas modificando a sua estrutura natural; é moderada em solventes com $\log P$ entre 2 e 4 e é alta em solventes apolares, onde $\log P > 4$ (FABER, 2011).

Para os sistemas formados por hexano e ciclohexano, as conversões em que o metanol foi empregado foram bastante semelhantes, sendo 68 e 64%, respectivamente. Solventes bastante apolares são muito aplicados na biocatálise utilizando lipases, pois propiciam um meio reacional que favorece o deslocamento do equilíbrio da reação enzimática para a rota sintética, uma vez que na presença de água a hidrólise se torna a reação favorecida (FABER, 2011; GOG *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2007).

Quando o solvente utilizado foi a ciclohexanona, a conversão em ésteres do ácido oleico foi reduzida a menos de 30%. Este solvente embora possua o mesmo número de carbonos dos outros solventes testados, possui uma característica diferenciada, conferida pelo grupamento cetona, uma boa solubilização em água. As enzimas são moléculas polares, que para manutenção de sua conformação tridimensional possuem ao seu redor uma espécie de “capa protetora” de água. Solventes com certa polaridade capturam essa água essencial para a enzima, modificando assim sua estrutura tridimensional, e muitas vezes levando a desnaturação do biocatalisador (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2009; PANDEY *et al.*, 1999). Aragão *et al.* (2009) realizaram a síntese do éster butirato de isoamila empregando lipases, e observaram que em sistemas contendo acetona como solvente a reação nem ocorreu, uma vez que esta é extremamente polar e deve ter capturado toda a água nativa da enzima, levando-a à desnaturação.

Como pode ser observado pelos resultados expressos na Figura 10, o hexano foi o solvente escolhido para testar a melhor razão molar entre ácido e álcool. Nas razões 1:6 e 1:9, o metanol apresentou rendimento superior ao etanol. O maior rendimento de reação, 81% de conversão, foi obtido com a razão molar 1:9, como pode ser observado na Figura 11.

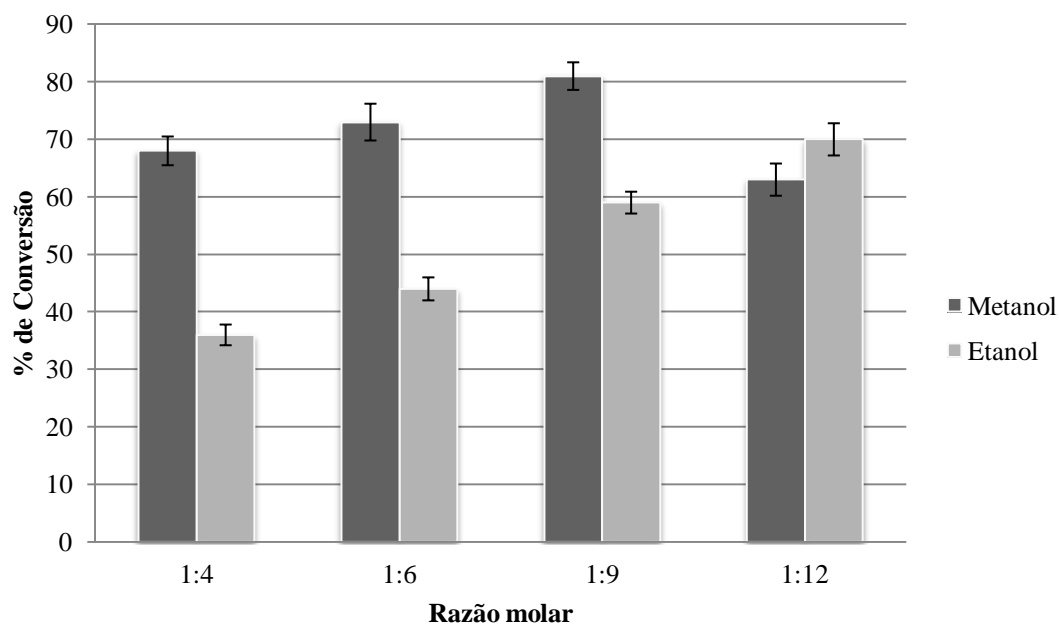


Figura 11. Efeito da razão molar ácido:álcool na esterificação do ácido oleico com etanol e metanol catalisada pela lipase de *Candida guilliermondii*. Condições: 2000 U, solvente hexano, 72 horas de reação a 30 °C e 180 rpm.

A porcentagem de esterificação utilizando etanol foi crescente em função do aumento da razão molar, mostrando que a reação pode alcançar níveis mais elevados, porém a utilização de grandes quantidades de etanol acaba tornando o processo dispendioso, sendo que o etanol é mais difícil de ser recuperado do meio reacional (GOG *et al.*, 2012; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2009).

O metanol geralmente apresenta rendimentos superiores aos do etanol para a síntese de ésteres por via química, devido à sua maior reatividade, e este álcool apresenta maior facilidade de ser recuperado do meio reacional, o que leva a um barateamento do processo (GOG *et al.*, 2012; GUAN *et al.*, 2010). A síntese enzimática empregando o metanol varia muito para cada enzima, sendo que algumas são completamente desnaturadas na presença deste álcool, devido a sua maior polaridade (TAN *et al.*, 2010), porém as enzimas deste estudo apresentaram tolerância a este álcool, sendo neste caso, o mais indicado para esta reação.

5.5.2 Síntese com as enzimas imobilizadas de *Candida guilliermondii*

As quatro diferentes formas da enzima imobilizada foram testadas na síntese do oleato de metila, e também um ensaio nas mesmas condições com a enzima livre foi conduzido para efeito comparativo. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 12.

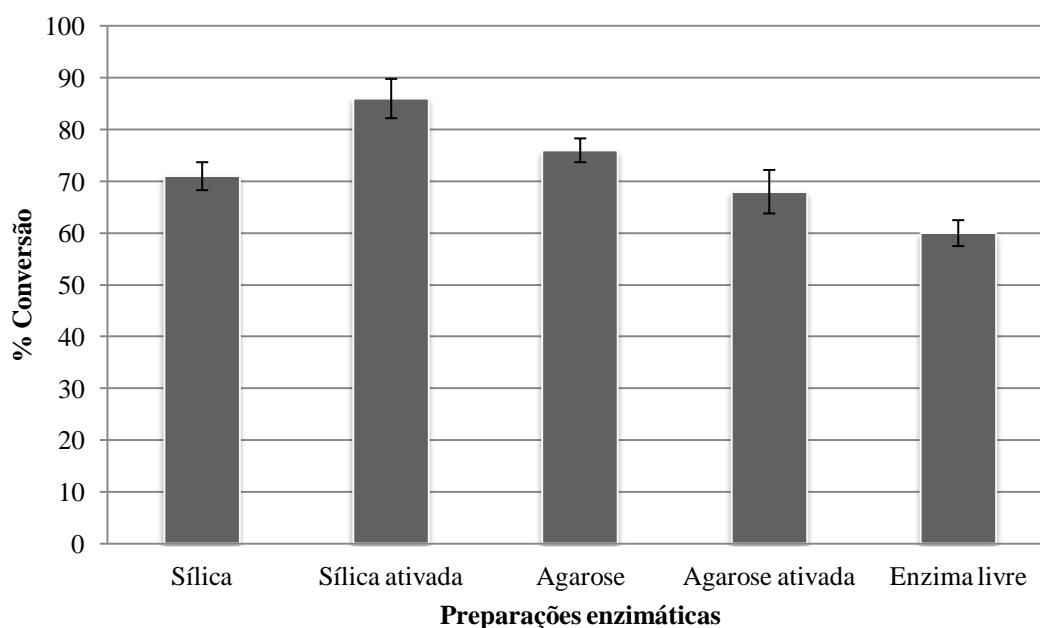


Figura 12. Conversão do ácido oleico em oleato de metila pelas enzimas imobilizadas e livre de *Candida guilliermondii*. Condições: 700U, razão molar 1:9, solvente hexano, 72 horas de reação a 30 °C e 180 rpm.

Como pode ser observado na Figura 12, todas as enzimas imobilizadas apresentaram rendimento superior ao da enzima livre, demonstrando que a imobilização foi bem sucedida em todos os suportes. Este fato pode ser explicado principalmente pela capacidade de proteção dos suportes imobilizadores, pois eles recobrem grande parte da estrutura proteica, protegendo-a da desnaturação.

A amostra imobilizada em sílica ativada foi a que apresentou maior conversão, 86%, um aumento significativo quando comparado aos 60% obtidos para a enzima livre. A sílica é um material bastante empregado na imobilização de enzimas, pois apresenta propriedades interessantes como a estabilidade e boas características mecânicas (LIMA *et al.*, 2001). Provavelmente este suporte foi capaz de proteger a enzima da desnaturação, pois além de proteger grande parte da enzima do solvente, a enzima mantém sua camada nativa de água, responsável pela manutenção da conformação proteica, que muitas vezes pode ser perdida em meio orgânico, sistema aplicado neste experimento (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; PAULA *et al.*, 2008; TAN *et al.*, 2010)

A imobilização é um processo muito peculiar, que varia drasticamente de uma enzima para outra e também nos diferentes suportes empregados. Aguiar *et al.* (2010) imobilizaram lipases em quitosana obtendo baixas atividades de hidrólise comparadas a atividade da enzima livre, enquanto que Silva *et al.* (2011) obtiveram rendimentos superiores na transesterificação do óleo de palma com uma lipase comercial imobilizada em relação a enzima livre. Hilal *et al.* (2006) imobilizaram lipases por ligação covalente, adsorção e por filtração, aplicando as enzimas imobilizadas na esterificação do ácido oleico, obtendo resultados superiores para a lipase de imobilização covalente em relação as outras duas preparações.

5.5.3 Reutilização das enzimas imobilizadas de *Candida guilliermondii*

Ensaio de reutilização foram conduzidos, para avaliar a capacidade de reuso das enzimas imobilizadas. Os resultados podem ser observados na Figura 13.

Três ciclos de reutilização foram testados para três preparações de enzimas imobilizadas. No primeiro ciclo as três mantiveram praticamente toda a sua atividade. No segundo ciclo todas mantiveram mais de 80% da atividade, com destaque para a imobilizada em agarose ativada que manteve 95%. No último ciclo as amostras de sílica mantiveram cerca de 60%, enquanto que a de agarose ativada manteve 75%. A maior atividade residual obtida foi na amostra

de agarose ativada, que mesmo não apresentando o maior rendimento de reação sua aplicação pode ser viável devido à possibilidade de reutilização.

Os resultados obtidos para o suporte agarose são justificados pelo fato deste material polimérico conferir uma proteção à estrutura nativa da enzima.

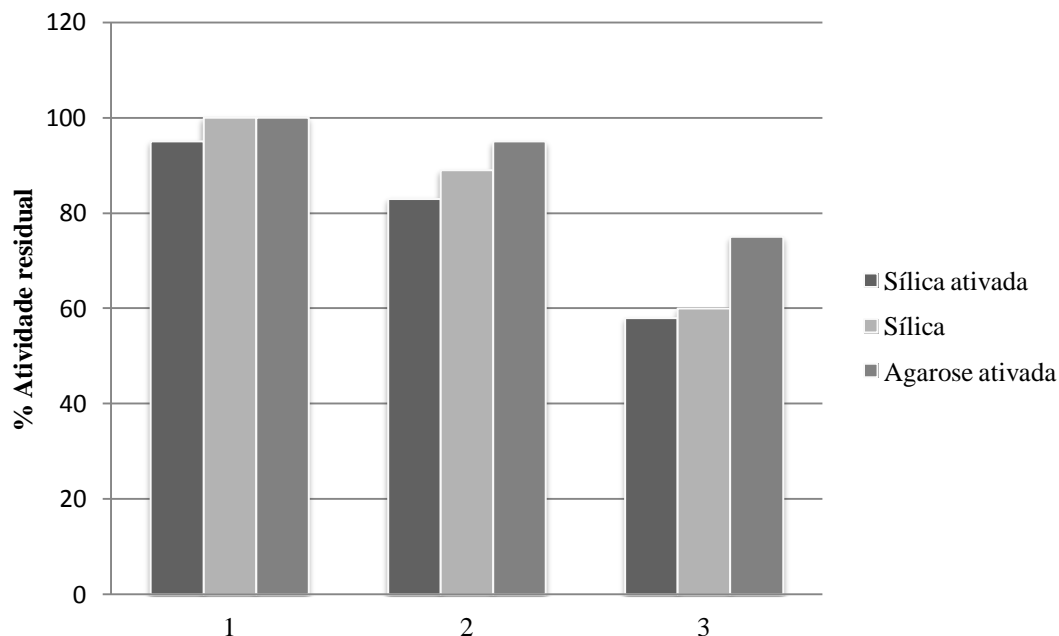


Figura 13. Atividade residual das enzimas de *Candida guilliermondii* imobilizadas após reutilizações.

Fernandes (2006) produziu lipases utilizando o sólido fermentado como suporte para a enzima produzida. Após 10 reutilizações manteve 90% da atividade residual. Paula *et al.* (2008) imobilizaram lipases por adsorção e por ligação covalente. Para a lipase imobilizada por adsorção, foi possível reutilizá-la apenas 2 vezes, enquanto a imobilizada por ligação covalente foi reutilizada 6 vezes.

5.6 ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO PELAS LIPASES DE *Penicillium sumatrense* e *Aspergillus fumigatus*

5.6.1 Reação com adição direta do sólido fermentado

A reação de síntese do oleato de metila foi acompanhada por 12 h, e os resultados obtidos podem ser observados na Figura 14.

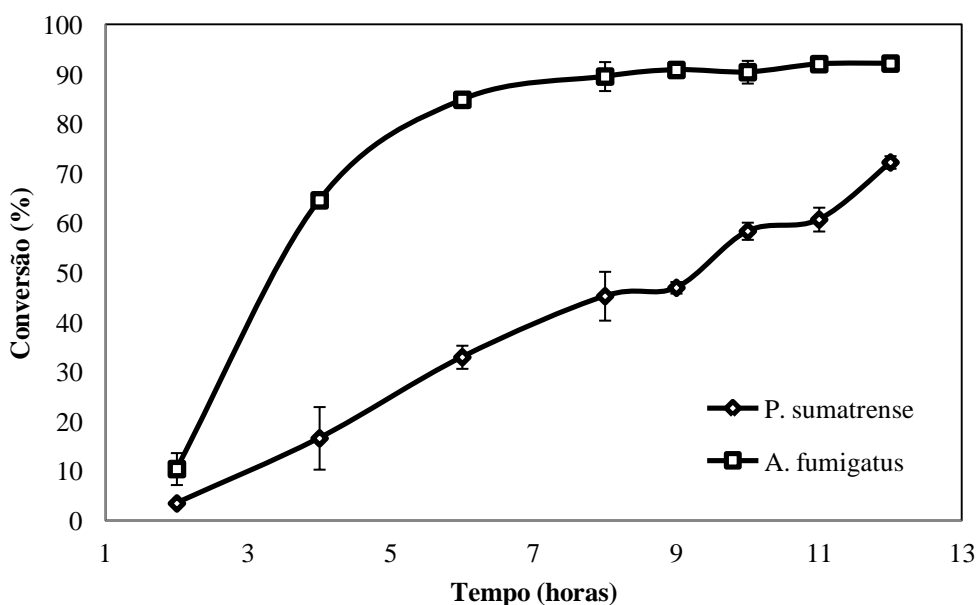


Figura 14. Esterificação do ácido oleico pelos sólidos fermentados obtidos de *Penicillium sumatrense* e *Aspergillus fumigatus*. Condições: 60U, razão molar 1:9, solvente hexano, 30 °C e 180 rpm.

Em 12 h de reação, a enzima de *P. sumatrense* apresentou cerca de 70% de conversão, enquanto que a enzima de *A. fumigatus* em 8 h de reação já apresentava aproximadamente 90% de conversão, com a mesma quantidade de biocatalisador, resultado bastante promissor para uma esterificação enzimática. Poucos estudos descrevem a aplicação do sólido fermentado diretamente em reações de síntese, em um deles, Fernandes *et al.* (2007) aplicou o sólido fermentado delipidado da bactéria *Burkholderia cepacia* na transesterificação do óleo de milho, obtendo 95% de conversão em 120 h,

utilizando a mesma quantidade de enzima e solvente aplicados neste experimento. Outro estudo que descreve a adição direta de sólido fermentado foi o de Salum *et al.* (2010) que aplicaram as lipases de *Burkholderia cepacia* na transesterificação do óleo de soja obtendo cerca de 95% de conversão em 46 h de reação para sistemas reacionais livres de solventes.

5.6.2 Escolha do melhor solvente e razão molar

Nas reações de esterificação do ácido oleico utilizando os sólidos fermentados como catalisador foram investigadas as melhores razões molares entre o ácido graxo e o metanol e o melhor solvente para as reações. Estes resultados podem ser observados nas Figuras 15 e 16, respectivamente.

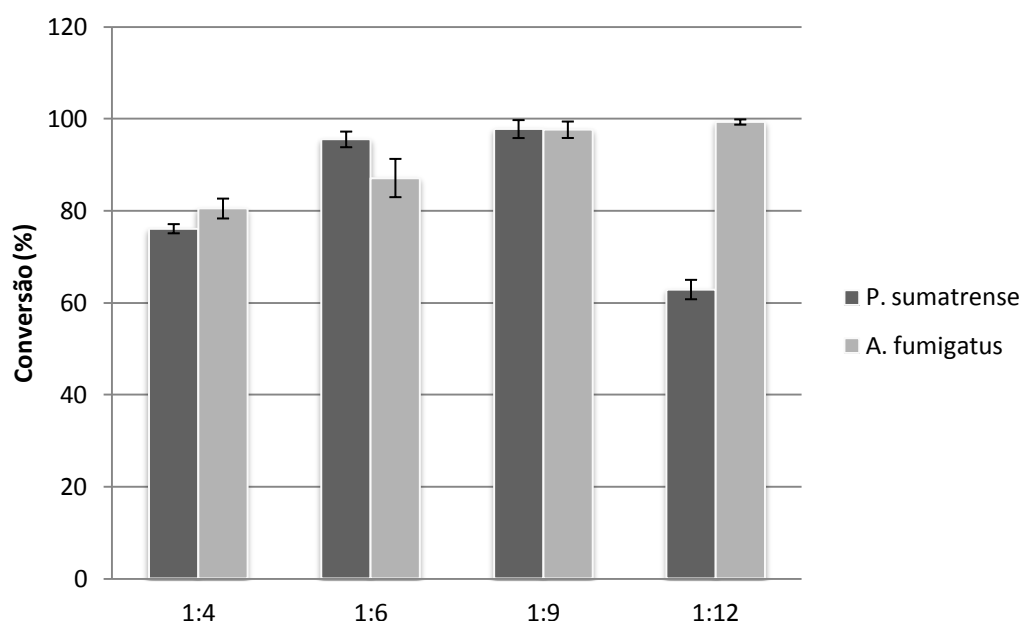


Figura 15. Efeito da razão molar entre ácido e álcool na esterificação do ácido oleico catalisada pelas lipases de *Penicillium sumatrense* e *Aspergillus fumigatus*. Condições: 60U, solvente hexano, 24 horas de reação 30 °C e 180 rpm.

Para a enzima de *P. sumatrense* a melhor razão molar encontrada foi a de 1:9 ($97,73 \pm 2,11\%$), apresentando um grande declínio de atividade quando

a razão molar foi elevada para 1:12. A enzima de *A. fumigatus* apresentou maior conversão na razão molar 1:12, apresentando $99,26 \pm 0,57\%$, porém na razão molar 1:9 apresentou conversão em torno de 98%, o que não justifica o uso de uma quantidade tão elevada de metanol. Em geral, as lipases sofrem forte desnaturação por metanol, porém neste estudo este fato não foi observado. Gog *et al.* (2012) descreveram que o grau de inativação enzimática é inversamente proporcional ao número de átomos de carbono do álcool utilizado. Uma solução para evitar a inativação enzimática é o uso de solventes no meio reacional, que diminuem o poder de desnaturação dos álcoois.

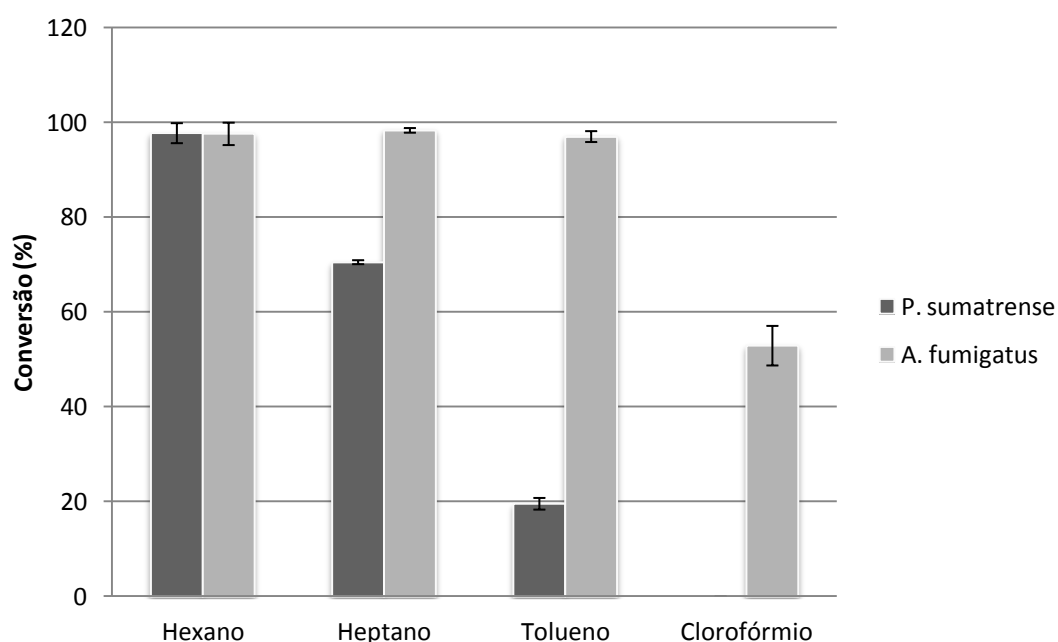


Figura 16. Efeito do solvente na esterificação do ácido oleico catalisada pelas lipases de *Penicillium sumatrense* e *Aspergillus fumigatus*. Condições: 60U, razão molar 1:9, solvente hexano, 24 horas de reação 30 °C e 180 rpm.

Aplicando a razão molar 1:9 para as duas enzimas o melhor solvente para as reações de síntese foi determinado. Para a enzima de *P. sumatrense* o solvente hexano foi o que apresentou maior taxa de conversão ($97,73 \pm 2,11\%$) enquanto que para os outros solventes houve grande decréscimo de atividade, chegando a não apresentar conversão para o solvente clorofórmio. A enzima de *A. fumigatus* apresentou maior tolerância aos solventes obtendo resultados

entre 97 e 98% de conversão para os solventes hexano, heptano e tolueno. Para o solvente clorofórmio a enzima apresentou apenas 53% de conversão.

Os solventes orgânicos afetam a atividade enzimática de três maneiras: interferindo na conformação proteica, interagindo com o substrato ou ainda interagindo com a camada de água encontrada ao redor da proteína (HERNANDEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2009). Laane *et al.* (1987) estabeleceram uma classificação para solventes orgânicos estabelecendo o coeficiente de partição ($\log P$), para o sistema bifásico octanol/água. Solventes apolares ($\log P$ em torno de 4) são os mais indicados para a biocatálise aplicando enzimas lipolíticas, pois solventes de baixo $\log P$, considerados hidrofílicos, possuem grande poder de desnaturação proteica, pois interagem com a camada protetora de água da proteína, podendo provocar distorções na conformação tridimensional. O clorofórmio é um solvente bastante hidrofílico ($\log P$ 2), e por este motivo não apresentou eficiência quando aplicado como meio reacional para a síntese do oleato de metila.

Aragão *et al.* (2009), testou diferentes solventes na síntese do butirato de isoamila e quando aplicou a acetona como meio reacional ($\log P$ -0,23) nem foi possível observar a ocorrência da reação, pois a enzima foi desnaturada completamente.

5.6.3 Reutilização do sólido fermentado

Os sólidos fermentados das duas enzimas foram aplicados na síntese do oleato de metila durante 15 ciclos, para observar a capacidade de reutilização dos biocatalisadores. As atividades residuais de cada ciclo podem ser observadas na Figura 17. As enzimas de *P. sumatrense* e *A. fumigatus* mantiveram atividade residual integral nos 4 ciclos iniciais, e a partir do quinto ciclo as enzimas começaram a apresentar um decaimento da atividade inicial. A lipase de *P. sumatrense* apresentou declínio mais acentuado de atividade, apresentando meia-vida no oitavo ciclo, e não apresentando atividade residual a partir da décima primeira reutilização. A lipase de *A.*

fumigatus apresentou meia vida a partir da décima terceira reutilização, e ainda no décimo quinto reciclo apresentou 28% de atividade residual.

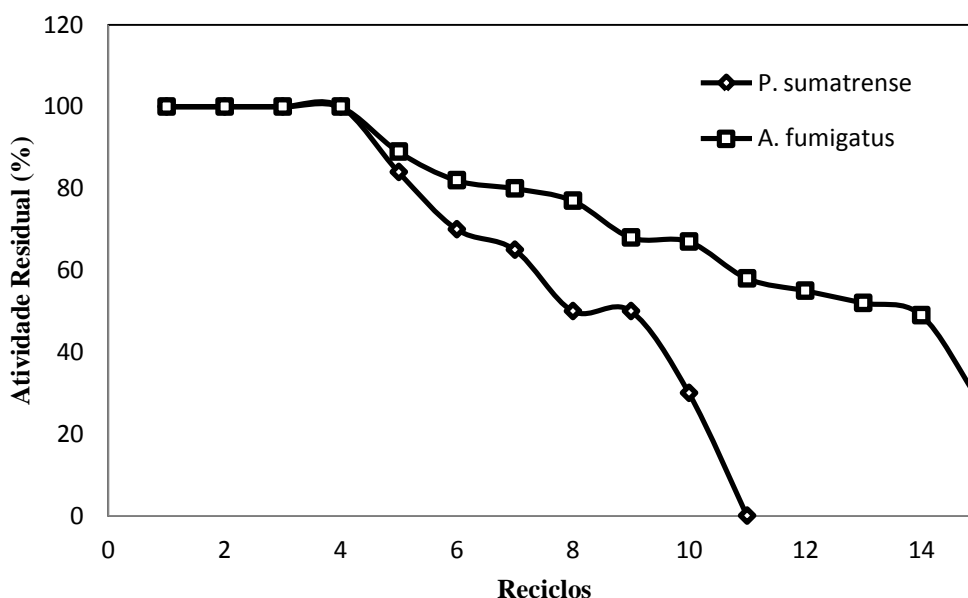


Figura 17. Reutilização dos sólidos fermentados de *Penicillium sumatrense* e *Aspergillus fumigatus* na síntese do oleato de metila.

Poucos estudos descrevem a aplicação direta do sólido fermentado, em um deles Fernandes (2006) aplicou sólido fermentado de *Burkholderia cepacia* na síntese do oleato de etila, fazendo sua reutilização em 14 reciclos e observou o tempo de meia vida apenas na décima quarta reutilização, resultado semelhante ao obtido para a lipase de *A. fumigatus*. O sólido fermentado atua como suporte para a enzima, fornecendo proteção a proteína e possibilitando sua reutilização.

Tran *et al.* (2012) imobilizaram lipases em nanocompósitos magnéticos, submetendo a enzima a 6 reciclos e seu tempo de meia-vida foi observada no quarto reciclo. Xie e Wang (2012) imobilizaram lipases em suportes magnéticos de quitosana para aplicação na transesterificação do óleo de soja e a meia-vida das enzimas imobilizadas por ligação covalente foi de apenas 5 reciclos.

A imobilização é um método interessante economicamente por possibilitar a reutilização do biocatalisador, porém o que geralmente observa-se após a imobilização é certa perda de atividade e mudanças nas propriedades cinéticas do catalisador, além de aumentar uma etapa no processo de

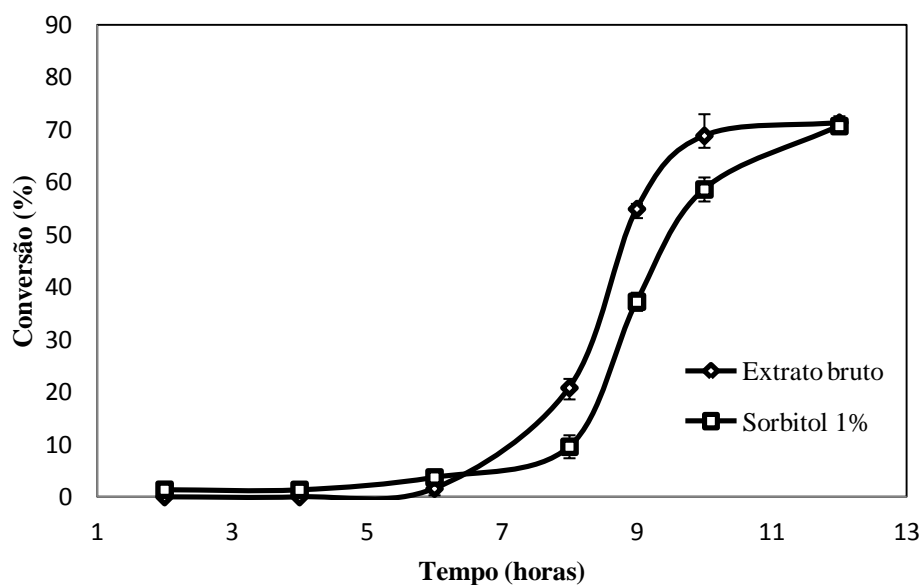
obtenção destes (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2012). A utilização do sólido fermentado além de representar uma diminuição no número de etapas da obtenção do biocatalisador, apresenta significativa redução de custos e boa manutenção da atividade inicial.

5.6.4 Reações com outras preparações enzimáticas

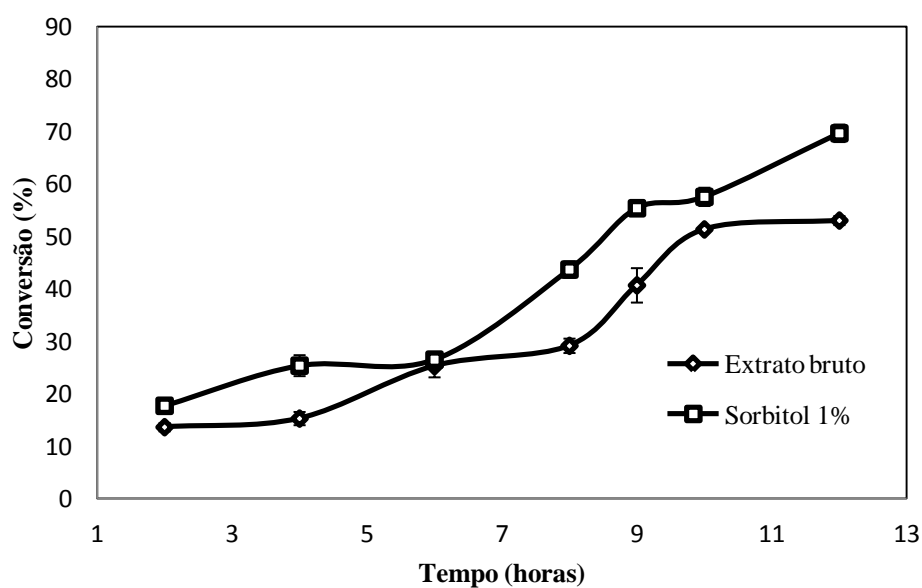
Além do sólido fermentado foram testadas outras preparações obtidas através do extrato bruto enzimático: extrato bruto puro, extrato bruto acrescido de sorbitol e as enzimas imobilizadas.

Na Figura 18 é possível observar a cinética da síntese do oleato de metila utilizando o extrato bruto e o extrato bruto acrescido de sorbitol. A enzima de *P. sumatrense* apresentou resultados muito semelhantes para ambas as preparações, em torno de 70% de conversão, enquanto que a enzima de *A. fumigatus* apresentou desempenho superior quando o extrato bruto foi acrescido de sorbitol, obtendo conversão máxima de $69,70 \pm 1,67\%$.

Em alguns casos os polióis são capazes de conferir proteção à camada nativa de água da enzima, evitando alterações na conformação em processos como o de liofilização e na presença de solventes orgânicos como no caso da lipase de *A. fumigatus*.



(A)



(B)

Figura 18. Esterificação do ácido oleico utilizando as lipases de (A) *Penicillium sumatrense* e (B) *Aspergillus fumigatus* no extrato bruto e acrescidas de sorbitol 1%. Condições: 60U, razão molar 1:9, solvente hexano, 30 °C e 180 rpm.

As lipases também foram imobilizadas em sílica e agarose por adsorção e ligação covalente. A recuperação da atividade enzimática pós-imobilização e

a cinética de síntese do oleato de metila para cada imobilização podem ser observadas nas Figuras 19 e 20, respectivamente.

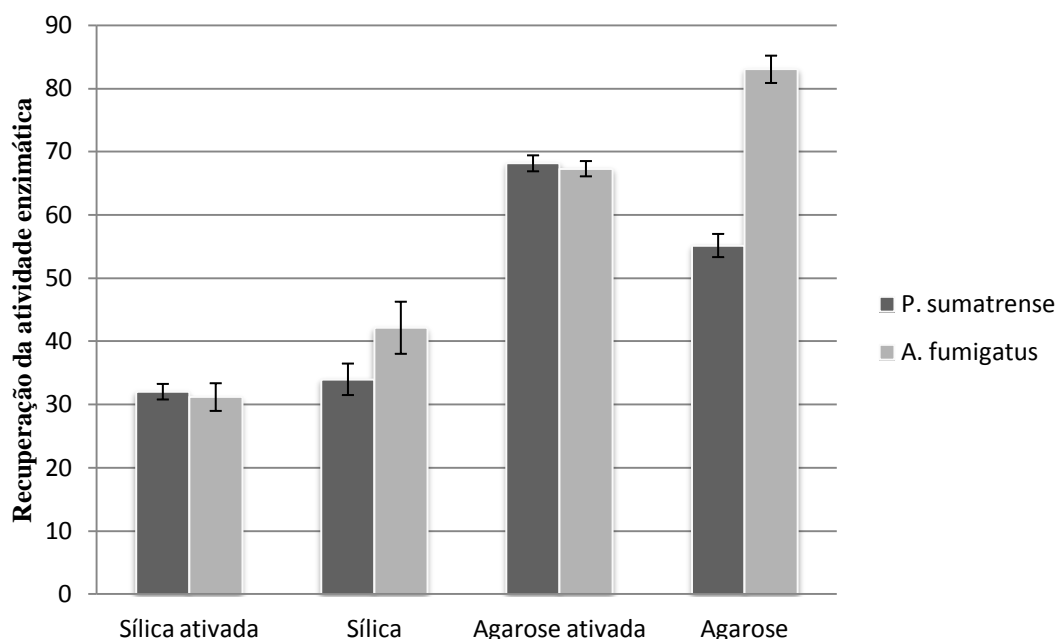
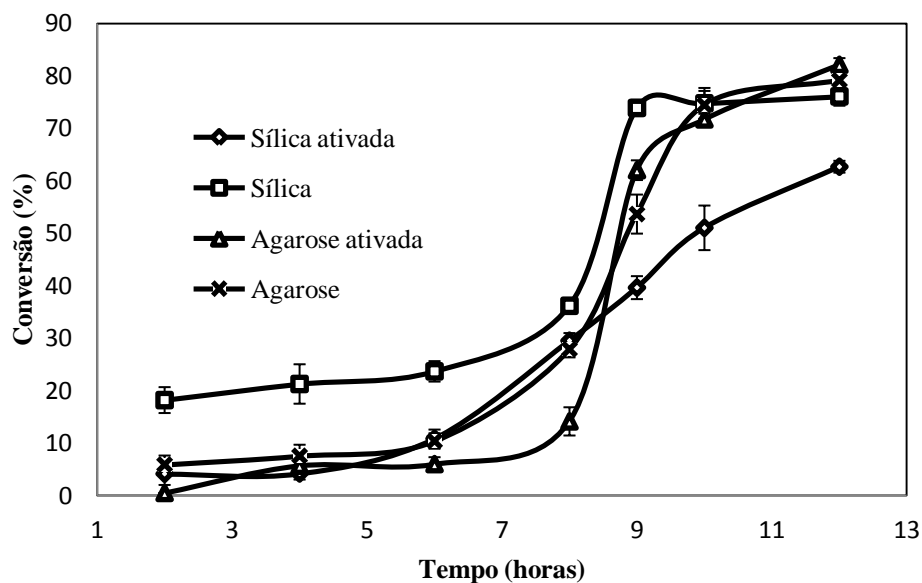


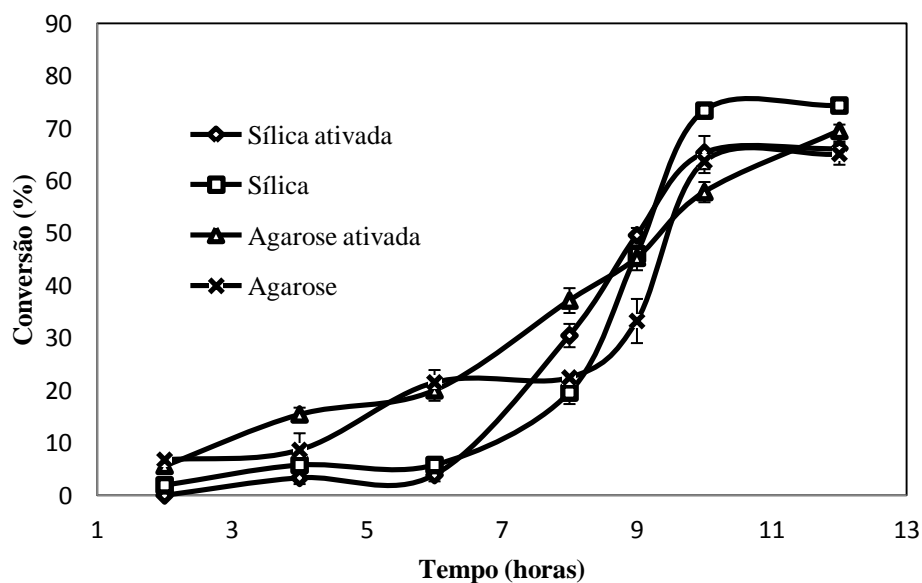
Figura 19. Recuperação da atividade enzimática de *Penicillium sumatrense* e *Aspergillus fumigatus* após o processo de imobilização.

A lipase de *P. sumatrense* imobilizada em agarose por ligação covalente apresentou o melhor desempenho ($82,13 \pm 1,27\%$) enquanto que a lipase de *A. fumigatus* apresentou desempenho semelhante nos quatro suportes, com conversão máxima de $74,34 \pm 1,05\%$ para a enzima imobilizada em sílica por adsorção.

Baron *et al.* (2005) avaliaram a síntese do oleato de butila aplicando diferentes preparações enzimáticas da lipase de *P. coryphilum* e obtiveram o resultado mais expressivo quando aplicaram a lipase no sistema de micela reversa, seguido pela enzima na forma livre, enquanto que a enzima quando imobilizada e na presença de um poliol apresentou resultados bem inferiores. Hilal *et al.* (2006) também realizaram a síntese do oleato de butila aplicando lipases imobilizadas em diferentes membranas por ligação covalente e não-covalente, obtendo conversão máxima em torno de 70% em 8 h de reação, resultado semelhante as enzimas imobilizadas neste trabalho.



(A)



(B)

Figura 20. Esterificação do ácido oleico utilizando as lipases de (A) *Penicillium sumatrense* e (B) *Aspergillus fumigatus* imobilizadas. Condições: 60U, razão molar 1:9, solvente hexano, 30 °C e 180 rpm.

As lipases de *P. sumatrense* e *A. fumigatus* catalisaram a esterificação do ácido oleico nas formas imobilizadas e no extrato bruto, porém ambas as preparações apresentaram desempenhos inferiores em comparação com as lipases imobilizadas diretamente no sólido fermentado. Este resultado pode ser explicado pelo fato do sólido fermentado ser o ambiente em que a enzima é secretada, e sua aplicação direta não passa por outros processos como é o caso da extração da enzima do meio fermentativo e do processo de imobilização, que podem resultar em alterações conformacionais na estrutura proteica.

5.6.5 Caracterização do oleato de metila

A amostra que apresentou a melhor taxa de conversão foi submetida a cromatografia gasosa, com a finalidade de confirmar a eficiência do método colorimétrico de Lowry-Tinsley (1976) no acompanhamento da reação de esterificação. De acordo com a cromatografia gasosa (Apêndice 2), os resultados obtidos pelo método colorimétrico foram confirmados, uma vez que a amostra analisada foi da cepa de *A. fumigatus* onde foi obtida conversão de $99,26 \pm 0,57\%$, e segundo a cromatografia a conversão em produto foi bem próximo a 100%, pois o ácido oleico não foi detectado na corrida, indicando uma boa correlação entre os métodos. Ainda no cromatograma é possível observar outros picos de ésteres além do oleato de metila. Este fato pode ser explicado pelo fato do sólido fermentado ter sido aplicado diretamente na reação de síntese sem passar pelo processo de delipidação, e como o meio reacional era composto por hexano, os ácidos graxos presentes no sólido fermentado foram extraídos, e esterificados juntamente ao ácido oleico.

A espectroscopia de RMN de ^1H foi utilizada com o propósito de caracterizar o éster metílico obtido da reação de esterificação do ácido oleico. Baseado no espectro é possível confirmar que o produto final da reação foi o oleato de metila. Os picos podem ser observados em δ (mg L^{-1}): 5,37 (m, 2H, **a**); 3,69 (s, 3H, **b**); 2,33 (t, $J = 7,17$, 2H, **c**); 2,05 (m, 4H, **d**); 1,65 (m, 2H, **e**);

1,32 (m, 20H, **f**); 0,91 (m, 3H, **g**). A estrutura química correspondente aos picos observados é apresentada na Figura 21.

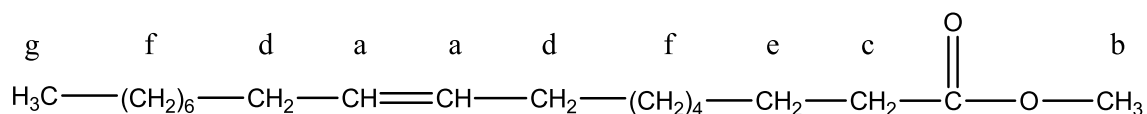


Figura 21. Grupos funcionais identificados pelo espectro do RMN de ^1H do oleato de metila.

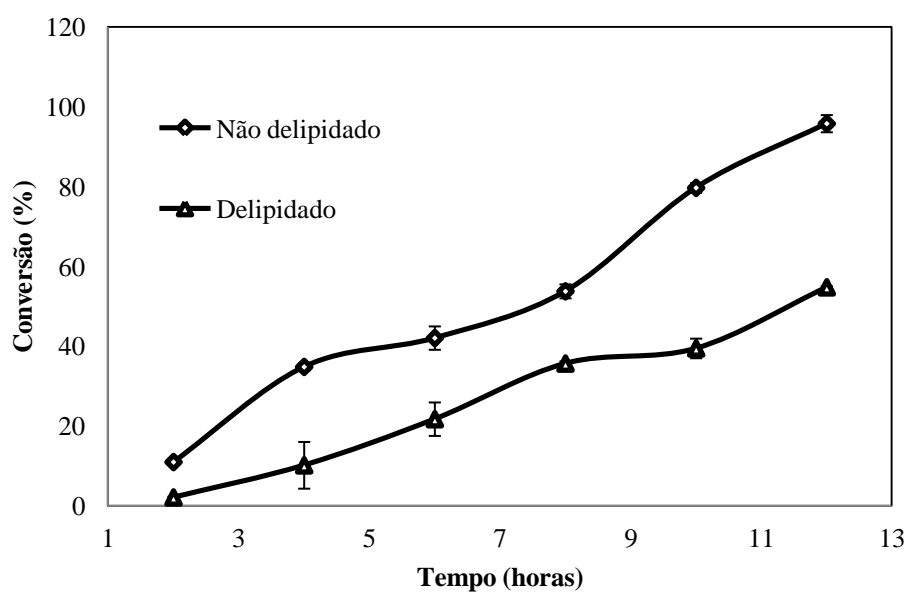
5.7 ESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MICROALGAS

5.7.1 Reação de esterificação com adição direta do sólido fermentado de *Penicillium sumatrense* e *Aspergillus fumigatus*

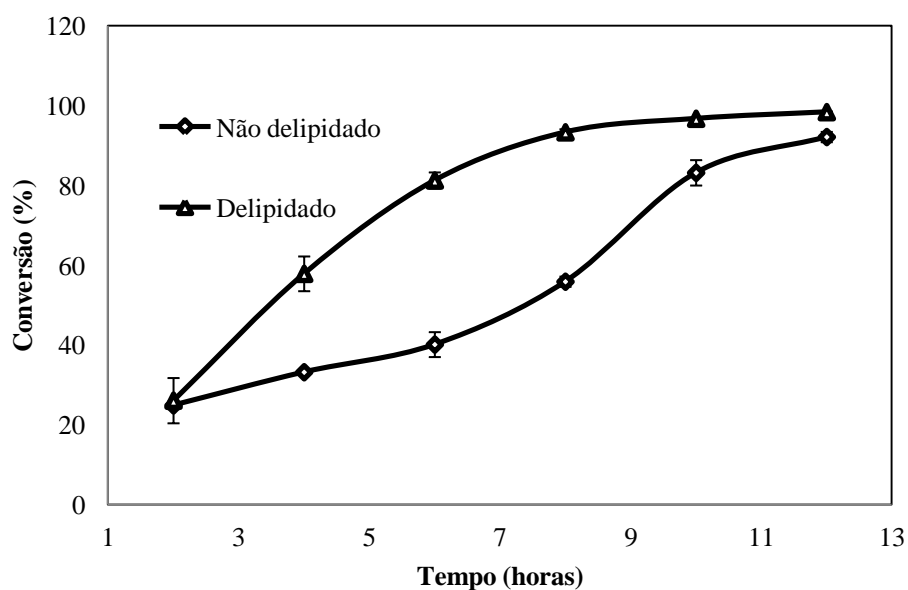
A síntese do biodiesel de microalgas foi conduzida seguindo as melhores condições obtidas para a síntese do oleato de metila. A adição direta do sólido fermentado contendo as lipases de *P. sumatrense* e *A. fumigatus* foi avaliada para a síntese do biodiesel. As conversões obtidas podem ser observadas na Figura 22.

O sólido fermentado sem nenhum tratamento e o sólido delipidado foram avaliados. O processo de delipidação visa remover os lipídios presentes no sólido fermentado, com a finalidade destes não interferirem nas reações de síntese.

A lipase de *P. sumatrense* apresentou maior conversão para o sólido não delipidado ($95,77 \pm 2,15\%$), e quando aplicado o sólido delipidado o desempenho foi bastante inferior. Este fato pode ser justificado pela menor estabilidade desta enzima frente a incubação em solventes orgânicos, perdendo a atividade drasticamente com sucessivos ciclos, como pôde ser observado nos resultados apresentados no item 5.6.3, sendo esta atividade provavelmente perdida durante o processo de delipidação.



(A)



(B)

Figura 22. Esterificação do óleo de microalgas utilizando o sólido fermentado sem tratamento e delipidado de (A) *Penicillium sumatrense* e (B) *Aspergillus fumigatus*.

A lipase de *A. fumigatus* apresentou maior conversão para o sólido delipidado ($98,35 \pm 0,16\%$). Esta enzima apresentou desempenhos bastante semelhantes para as duas preparações do sólido fermentado, confirmando a

boa estabilidade em solventes orgânicos desta lipase, quando comparada a lipase obtida de *P. sumatrense*.

A técnica de cromatografia gasosa foi aplicada para confirmação destes resultados, observando que para a amostra delipidada, a conversão foi de cerca de 100%, pois não foi possível observar a presença de ácidos graxos livres no cromatograma (Apêndice 4). Poucos trabalhos descrevem a aplicação direta do sólido fermentado em reações de síntese, em um deles Fernandes *et al.* (2007) compara o desempenho da lipase de *Burkholderia cepacia* no sólido fermentado delipidado e não-delipidado. Assim como neste trabalho os resultados para as duas preparações foram bastante semelhantes, sugerindo ser desnecessária a delipidação, pois este procedimento acaba elevando o custo do processo como um todo, dificultando a competição dos biocatalisadores com os catalisadores tradicionais.

Com a finalidade de caracterizar o produto obtido foi aplicada a técnica de RMN de ^1H . Os picos podem ser observados em δ (mg L^{-1}): 5,37 (m, 2H, **a**); 3,69 (s, 3H, **b**); 2,33 (t, $J = 7,17$, 2H, **c**); 2,05 (m, 4H, **d**); 1,65 (m, 2H, **e**); 1,32 (m, 20H, **f**); 0,91 (m, 3H, **g**). A estrutura química genérica correspondente aos picos observados é apresentada na Figura 23, confirmando a formação de ésteres metílicos.

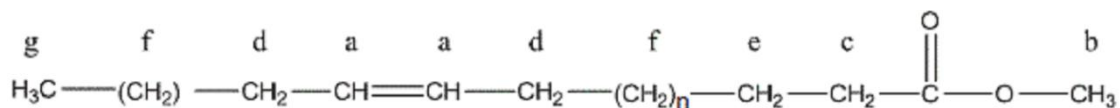


Figura 23. Grupos funcionais identificados pelo espectro do RMN de ^1H do biodiesel de microalgas.

A utilização do óleo de microalgas para síntese de biodiesel tem sido bastante investigada, porém a aplicação de enzimas na catálise desta reação ainda é pouco explorada, tornando-se difícil estabelecer uma comparação entre o presente trabalho e as pesquisas já publicadas.

Tran *et al.* (2012) aplicaram lipases imobilizadas na transesterificação do óleo da microalga *Chlorella vulgaris*, obtendo uma de conversão de 97% em 48 h. Lai *et al.* (2012) utilizaram líquido iônico como meio reacional para síntese de biodiesel de microalgas, obtendo cerca de 90% de conversão em 48 h de reação. Ambos os resultados são promissores, pois a síntese enzimática

apresenta uma série de vantagens sobre as reações químicas, porém as reações citadas requerem sistemas sofisticados como, por exemplo, o de imobilização, enquanto que o sistema proposto neste trabalho além de simples e de baixo custo apresentou altos rendimentos em menos de 12 h de reação.

6. CONCLUSÃO

Os estudos realizados permitem concluir que:

- A obtenção de biomassa de microalgas por cultivo heterotrófico é bastante promissora, pois mesmo necessitando da adição de uma fonte orgânica de carbono, este sistema de cultivo apresenta elevada produção de biomassa quando comparada ao cultivo autotrófico. Neste estudo a produção de biomassa apresentou-se cerca de 20 vezes maior que a obtida em cultivo autotrófico.
- O óleo obtido da biomassa foi caracterizado e sua composição predominante é dos ácidos oleico, palmítico e linoleico. Esta composição confere ao biodiesel características semelhantes ao biodiesel obtido de oleaginosas.
- Algumas cepas microbianas foram estudadas para avaliar a produção de enzimas lipolíticas. Destas, as cepas de *Candida guilliermondii*, *Penicillium sumatrense* e *Aspergillus fumigatus* foram as que apresentaram maior expressividade para a produção de lipases.
- A FES e a FSm foram avaliadas para a produção de lipases, sendo que a FES apresentou maior produção da enzima para as cepas fúngicas pela fato destas se adaptarem melhor a este sistema fermentativo devido ao seu crescimento micelial, enquanto que a levedura *C. guilliermondii* apresentou maior produção da enzima na fermentação submersa.
- A enzima de *C. guilliermondii* foi produzida em altas concentrações e a sua produção em biorreator foi bastante semelhante à produção obtida em escala Erlenmeyer, indicando que esta cepa pode ser aplicada para produção de metabólitos em maior escala sem a necessidade de grandes adaptações do sistema proposto.
- Embora tenha sido possível produzir a enzima de *C. guilliermondii* em grande escala e com meio de baixo custo, esta lipase quando aplicada na síntese do oleato de metila apresentou rendimento significativo

apenas em 72 h de reação, tempo muito longo para a reação de obtenção do biodiesel. Devido a sua simples obtenção, esta enzima deve ser investigada para outras aplicações não investigadas neste trabalho, como por exemplo, a sua adição a detergentes e fármacos.

- As lipases de *P. sumatrense* e *A. fumigatus* foram obtidas via fermentação no estado sólido e diversas preparações enzimáticas foram avaliadas na síntese do oleato de metila. A adição direta do sólido fermentado de *A. fumigatus* apresentou rendimentos superiores a 90% em 12 h de reação.
- A adição direta do sólido fermentado além de apresentar o melhor rendimento da reação de síntese do oleato de metila, apresentou baixo custo de obtenção da enzima, assim como a capacidade de reutilização, com consequente barateamento do processo.
- Para síntese do biodiesel de microalgas os sólidos fermentados sem tratamento e delipidado de *A. fumigatus* e *P. sumatrense* foram avaliados. A lipase de *P. sumatrense* sem tratamento apresentou a melhor condição, enquanto que a lipase de *A. fumigatus* apresentou desempenho semelhante para as duas preparações.
- O tratamento de delipidação do sólido fermentado não apresentou ganhos aos processos, indicando ser desnecessário este tratamento para os sólidos fermentados para aplicação na síntese do biodiesel.
- A síntese do biodiesel de microalgas apresentou altos rendimentos (acima de 95%) em 12 h de reação. Este resultado é bastante satisfatório, pois para a síntese foram empregados catalisadores de baixo custo possibilitando uma comparação aos catalisadores químicos comumente usados.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho abordou a síntese enzimática do biodiesel de microalgas, e se mostrou original em dois aspectos: (1) Na aplicação direta do sólido fermentado na síntese de biodiesel e (2) na aplicação de um catalisador biológico na síntese do biodiesel de microalgas.

A partir dos resultados obtidos é possível sugerir para trabalhos futuros:

- Desenvolver reatores para a produção em maior escala de lipases por fermentação no estado sólido.
- Aplicar as lipases obtidas em reações de esterificação e transesterificação de outros óleos, em especial óleo de soja e sebo.
- Utilizar o sólido fermentado contendo as enzimas lipolíticas em reações de síntese do biodiesel em escala de biorreator.
- Otimizar as condições de síntese enzimática do biodiesel de microalgas.
- Determinar as propriedades do biodiesel de microalgas obtido via esterificação enzimática.
- Avaliar o custo de produção de biodiesel de microalgas utilizando as enzimas em relação a um processo tradicional.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, D.; PATINAR, P.; BANERJEE, T.; PATIL, S. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 977-981, 2004.

AGUIAR, R.O.; MONDARDO, R.M.; AGNES, E.J.; CASTRO, H.F.; PEREIRA, E.B. Avaliação e comparação da eficiência de imobilização de lipase pancreática em quitosana para produção de ácidos graxos em frascos agitados. **Acta Scientiarum.Technology**, v. 32, p. 15-19, 2010.

AHMAD, A.L.; YASIN, N.H.M; DEREK, C.J.C.; LIM, J.K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 584–593, 2011.

AMARO, H.M., GUEDES, A.C.; MALCATA, F.X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, p. 3402–3410, 2011.

ANDERSEN, R.A. **Algal culturing techniques**. 1. ed. California: Elsevier, 2005.

ANDRADE, M.R.,e COSTA, J.A.V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência Agrotécnica**, v. 32, p. 1551-1556, 2008.

ARAGÃO, V.C.; ANSCHAU, A.; PORCIUNCULA, B.D.A.; THIESEN, C.; KALIL, S. J.; BURKERT, C.A.V.; BURKERT, J.F.M. Síntese enzimática do butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. **Química Nova**, v. 32,p. 2268-2272, 2009.

AZMA, M.; MOHAMED, M.S.; MOHAMAD, R.; RAHIM, R.A.; ARIFF, A.B. Improvement of médium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 187-195, 2011.

BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P.N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: Na overview. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 9-14, 2010.

BARON AM, SARQUIS MIM, BAIGORI M, MITCHELL DA, KRIEGER N. A comparative study of the synthesis of *n*-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium coryophilum* in water-restricted environments. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 34, p. 25-32, 2005.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 175–185, 2012.

BERTOLDI, F.C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J.L.B. Revisão: Biotecnologia de microalgas. **Boletim CEPPA**, v. 26, p. 9-20, 2008.

BON, E.P.S; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia – Produção, aplicação e mercado**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BRASIL. Agência nacional de Petróleo. Resolução ANP nº 7. 19 de março de 2008. Diário Oficial da União. 20/03/2008.

BUSSAMARA, R.; FUENTEFRIA, A.M.; OLIVEIRA, E.S.; BROETTO, L.; SIMCIKOVA, M.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 268–275, 2010.

CAMPOS, V.B; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S.O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural**, v. 40, p. 339 – 347, 2010.

CARVALHO JÚNIOR, R. M.; VARGAS, J. V. C.; RAMOS, L. P.; MARINO, C. E. B.; TORRES, J. C. L. Microalgae biodiesel via in situ methanolysis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, p. 1418-1427, 2011.

CHAICHALERM, S; POKETHITIYOOK, P.; YUAN, W.; MEETAM, M.; SRITONG, K.; PUGKAEW, W.; KUNGVANSAICHOL, K.; KRUATRACHUE, M.; DAMRONGPHOL, P. Culture of microalgal strains isolated from natural habitats in Thailand in various enriched media. **Applied Energy**, v. 89, p. 296–302, 2012.

CHU, S.P. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. **Journal of Ecology**, v. 30, p. 284-325, 1942.

CONTESINI, F.J.; LOPES, D.B.; MACEDO, G.A.; NASCIMENTO, M.G.; CARVALHO, P.O. *Aspergillus* sp. lipases: potencial biocatalyst for industrial use. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 163-171, 2010.

DALLA-VECCHIA, R; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

DAMASO, M.C.T.; PASSIONOTO, M.A.; FREITAS, S.C.; FREIRE, D.M.G.; LAGO, R.C.A.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 39, p. 676 - 681, 2008.

D'AQUINO, C.A.; MUNARO, M.; BALMANT, W.; VARGAS, J.V.C.; AMICO, S.C.; RIBEIRO, R.L.L. A simplified mathematical model to predict PVC photodegradation in photobioreactors. **Polymer Testing**, v. 31, p. 638-644, 2012.

DERNER, R.B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S.M.; FETTS, R. Microalgas: produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1959 - 1957, 2006.

DIAZ, J.C.M. RODRÍGUEZ, S.; ROUSSOS, J.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIÈRE, F.; BARATTI, J. Lipases from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme Microbial Technology**, v. 39, p. 1042-1050, 2006

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry. A Textbook**. 6. ed. New York: Springer, 2011.

FENG, Y.; LI, C.; ZHANG, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 101-105, 2011.

FERNANDES, M. L. M. **Hidrólise de triglicerídeos e síntese de éster de ácido graxo em sistema de micelas reversas**. 2002. 120f. Dissertação (Mestrado em Química) - Setor de Ciências Exatas - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2002.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2006. 130f. Tese (Doutorado em Química) - Setor de Ciências Exatas - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

FERNANDES, M.L.M.; SAAD, E.B.; MEIRA, J.A.; RAMOS, L.P.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, p. 8-13, 2007.

FRANKEN, L.P.G. **Avaliação da atividade hidrolítica de lipases em propano pressurizado**. 2007. 80f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Faculdade de Agronomia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2007.

GERMANO, S. **Desenvolvimento de bioprocessos para produção, caracterização e purificação de proteases de *Penicillium* sp. por fermentação no estado sólido**. 2000. 142f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Setor de Tecnologia - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2000.

GHORI, M.I.; IQBAL, M.J.; HAMED, A. Characterization of a novel lipase from *Bacillus* sp. isolated from tannery wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 22-29, 2011.

GOG, A.; ROMAN, M.; TOS, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F.D. Biodiesel production using enzymatic transesterification e Current state and perspectives. **Renewable Energy**, v. 39, p. 10–16, 2012

GUAN, F.; PENG, P.; WANG, G.; YIN, T.; PENG, Q.; HUANG, J.; GUAN, G.; LI, Y. Combination of two lipases more efficiently catalyzes methanolysis of soybean oil for biodiesel production in aqueous medium. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1677-1682, 2010.

GUIMARÃES, T.M. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomices cerevisiae* para elaboração de vinho**. 2005. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

HERNANDEZ-RODRIGUEZ, B.; CÓRDOVA, J.; BARZANA, E.; FAVELATORRES, E. Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 61, p. 136-142, 2009.

HILAL, N.; KOCHKODA, V.; NIGMATULLIN, R.; GONCHARUK, V.; AL-KHATI, L. Lipase-immobilized biocatalytic membranes for enzymatic esterification:

Comparison of various approaches to membrane preparation. **Journal of Membrane Science**, v. 268, p. 198–207, 2006.

IFTIKHAR, T.; NIAZ, M.; ZIA, M.A.; HAQ, I. Production of extracellular lipases by *Rhizopus oligosporus* in a stirred fermentor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 1124–1132, 2010.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v.16, p. 396 – 403, 1998.

KAMINI, N.R.; FUJII, T.; IEFUJI, H. Production, purification and characterization of naextracellular lipase front eh yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 317-234, 2000.

KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J.; RAMOS, L.P. **Manual do biodiesel**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2006.

LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering** . v. 30, p. 81-87, 1987.

LAI, J.Q.; HU, Z.L.; WANG, P.W.; YANG, Z. Enzymatic production of microalgal biodiesel in ionic liquid [BMIm] [PF₆]. **Fuel**, v. 95, p. 329-333, 2011.

LI, J; LI, L; TONG, J; WANG, Y; CHEN, S. Research development on lipase-catalyed biodiesel. **Energy Procedia**, v. 16, p. 1014– 1021, 2012.

LIANG, Y. Production liquid transportation fuels from heterotrophic microalgae. **Applied Energy**, v. 104, p. 860–868, 2013.

LIMA, J.R.O.; SILVA, R.B.; SILVA, C.C.M.; SANTOS, L.S.S.; SANTOS JUNIOR, J.B.; MOURA, E.M.; MOURA, C.V.R. Biodiesel de babaçu (*Orbignya* sp.) obtido por via etanólica. **Química Nova**, v. 30, p. 600 - 603, 2007.

LIMA, U. DE A; AQUARONE, E; BORZANI, W; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial volume 3: processos fermentativos e enzimáticos**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

LIMA, V.M.G., KRIEGER, N., SARQUIS, M.I.M., MITCHELL, D.A., RAMOS,

L.P., FONTANA, J.D. Effect of the nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, p. 105-110, 2003.

LIU, Y.; LI, C.; MENG, X.; YAN, Y. Biodiesel synthesis directly by the fermented solid of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation. **Fuel Processing Technology**, v. 106, p. 303–309, 2013.

LÔBO, I.P.; FERREIRA, S.L.C.; CRUZ, R.S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, p. 1596 - 1608, 2009.

LORENTZ, R.H. **Seleção de isolados de *Paenibacillus* spp. com atividade enzimática e antimicrobiana**. 2005. 103f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Faculdade de Agronomia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005.

LOWRY, R.R.; TINSLEY, J.I. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. **Journal American Oil Chemical Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.

MOHAMED, S.A.; ABDEL-MAGEED, H.M.; TAYEL, S.A.; EL-NABRAWI, M.A.; FAHMY, A.S. Characterization of *Mucor racemosus* lipase with potencial application for the treatment of cellulite. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 642-648, 2011.

MORAIS, K. C. C.; RIBEIRO, R. L. L.; SANTOS, K. R.; TAHER, D.M.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C. *Phaeodactylum tricornutum* micrálage growth rate in heterotrophic and mixotrophic conditions. **Engenharia Térmica**, v. 8, p. 84-89, 2009

OLIVEIRA, A.C.D., WATANABE, F.M.F., RODRIGUES, M.L.F. Comparação entre fermentação no estado sólido e fermentação submersa para a produção de alfa-amilases por *Penicillium* sp. e caracterização da enzima. **Biociências, Biotecnologia e Saúde**, v. 1, p. 43– 54, 2011.

OLIVEIRA, A.C.D., WATANABE, F.M.F., VARGAS, J.V.C., MARIANO, A.B., RODRIGUES, M.L.F. Comparação entre três bioprocessos para a produção de enzimas proteolíticas utilizando resíduos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, p. 822– 831, 2012a.

OLIVEIRA, A.C.D., WATANABE, F.M.F., VARGAS, J.V.C., RODRIGUES, M.L.F., MARIANO, A.B. Production of methyl oleate with a lipase from an endophytic yeast isolated from castor leaves. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 295– 300, 2012b.

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C.R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999.

PAQUES, F.W., MACEDO, G.A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, p. 93-99, 2006.

PAULA, A.V.; MOREIRA, A.B.R; BRAGA, L.P.; CASTRO, H.F. Comparação do desempenho de lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinil álcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v. 31, p. 35-40, 2008.

RIBEIRO, R. L. L.; MARIANO, A. B.; SOUZA, J. A.; VARGAS, J. V. C. Transient modeling and simulation of compact photobioreactor. **Engenharia Térmica**, v. 7, p. 66-71, 2008.

RODRIGUES, R.C. **Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleo vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual**. 2009. 183f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

SALIHU, A.; ALAM, M.Z.; KARIM, M.I.A.; SALLEH, H.M. Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design. **Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic**, v. 69, p. 66-73, 2011.

SALIHU, A.; ALAM, M.Z.; ABDULKARIM, M.I.; SALLEH, H.M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36–44, 2012.

SALUM, TFC; VILLENEUVE, P; BAREA, B; YAMAMOTO, CI; CÔCCO, LC; MITCHELL, DA; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1348–1354, 2010.

SATYANARAYANA, K. G.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. **International Journal of Energy Research**, Curitiba, v. 35, p. 291-311, 2011.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEEA, U.C, Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SILVA, A. G.; CARTER, R.; MERSS, F. L. M.; CORRÊA, D. O.; VARGAS, J.V.C.; MARIANO, A. B.; ORDONEZ, J. C.; SCHERER, M. D. Life cycle assessment of biomass production in microalgae compact photobioreactors. **Global Change Biology Bioenergy**, 2013 (não publicado).

SILVA, G.S.; INOUE, D.Y.; DORS, G.; FURIGO JUNIOR, A.; CASTRO, H.F. Desempenho de diferentes lipases imobilizadas na síntese de biodiesel de óleo de palma. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, p. 197-203, 2011.

SOARES, D.; MARIANO, A. B.; Becker, A. G.; VARGAS, J. V. C.; LUZ JUNIOR, L. F. L.; NOSEDA, M. D.; MITCHELL, D. A. Metodologias para obtenção de biomassa e extração de lipídeos de microalgas marinhas. In: PEREIRA, T. C. G. (Copel - Paraná). (Org.). **Dossiê de Pesquisa Fontes Renováveis de Energia**. 1ed. Curitiba: Via Laser Gráfica e Editora, 2010, p. 147-159.

STRINGARI, D. **Sistemática e diversidade genética de isolados de *Guignardia* spp. e *Phyllosticta* sp. nos estados do Paraná e São Paulo**. 2009. 209f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

SUAREZ, P.A.Z.; SANTOS, A.L.F.; RODRIGUES, J.P.; ALVES, M.B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabiliza-los. **Química Nova**, v. 32, p. 768 - 775, 2009.

SUGAI-GUERIOS, M. H.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C.; LUZ JUNIOR, L. F. L.; MITCHELL, D. A. Mathematical model of the CO₂ solubilization reaction rates developed for the study of photobioreactors. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, 2013 (não publicado).

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipases: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 628-634, 2010.

TORRENS, J.; VARGAS, J. V. C.; TELLES, E. C.; MARIANO, A. B.; ORDONEZ, J. C. Biodiesel from microalgae: the effect of fuel properties on pollutant emissions. **Engenharia Térmica**, v. 7, p. 35-43, 2008.

TRAN, D.T.; YEH, K.L.; CHEN, C.L.; CHANG, J.S. Enzymatic transesterification of microalgal oil from *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized *Burkholderia* lipase. **Bioresource Technology**, v. 108, p. 119-127, 2012.

VARGAS, V. J. C.; BALMANT, W.; STALL, A.; MARIANO, A. B.; ORDONEZ, J. C.; HOVSAPIAN, Z.; DILAY, E. **Photobioreactor System**. US2012088296-A1 / WO2012050608-A1, 12 out. 2011, 12 abr, 2012.

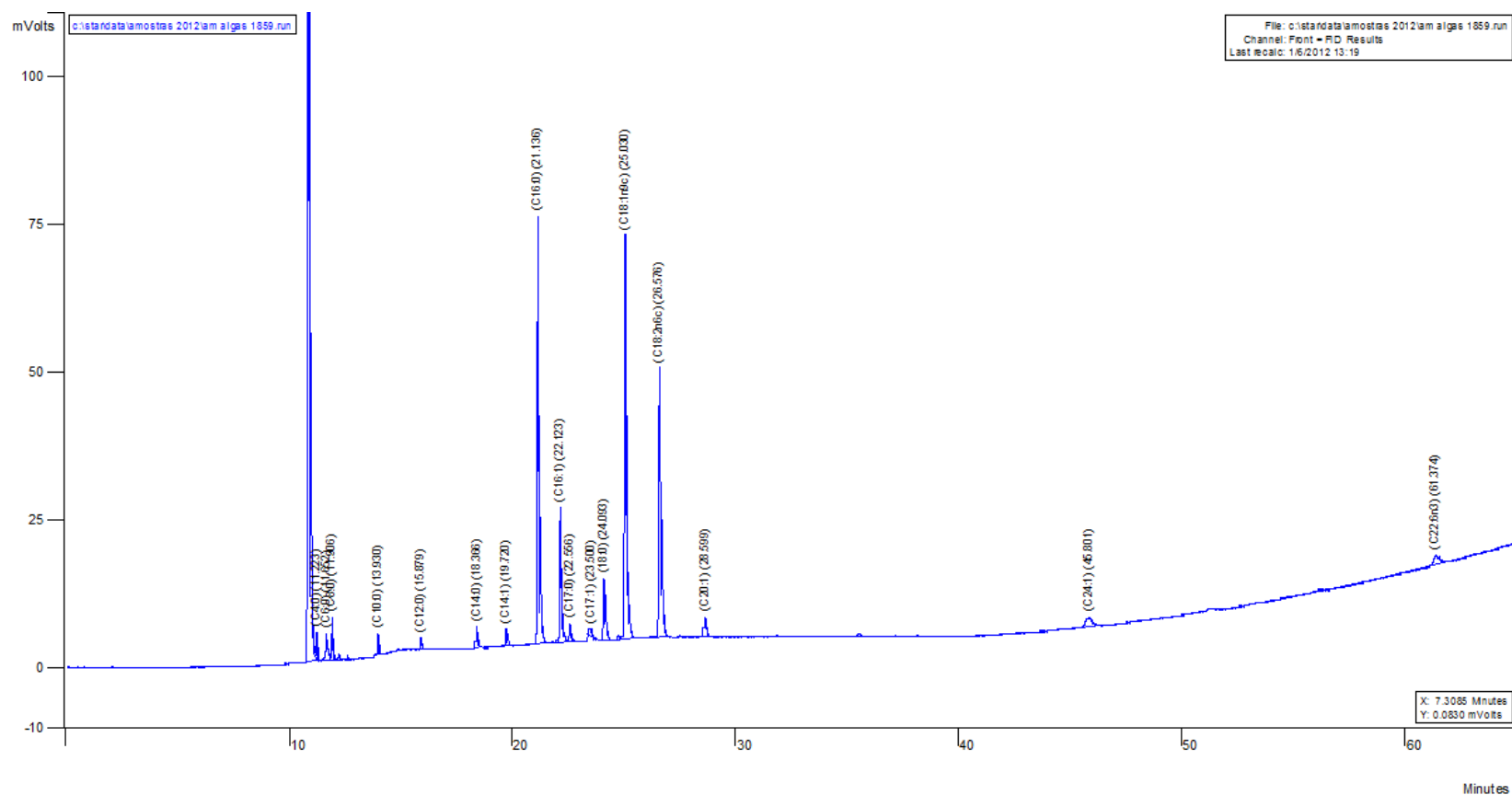
XIE, W.; WANG, J. Immobilized lipase on magnetic chitosan microspheres for transesterification of soybean oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 36, p. 373-380, 2012.

ZHENG, Y.; CHI, Z.; LUCKER, B.; CHEN, S. Two-stage heterotrophic and phototrophic culture strategy for algal biomass and lipid production. **Bioresource Technology**, v. 103, p. 484-4889, 2012.

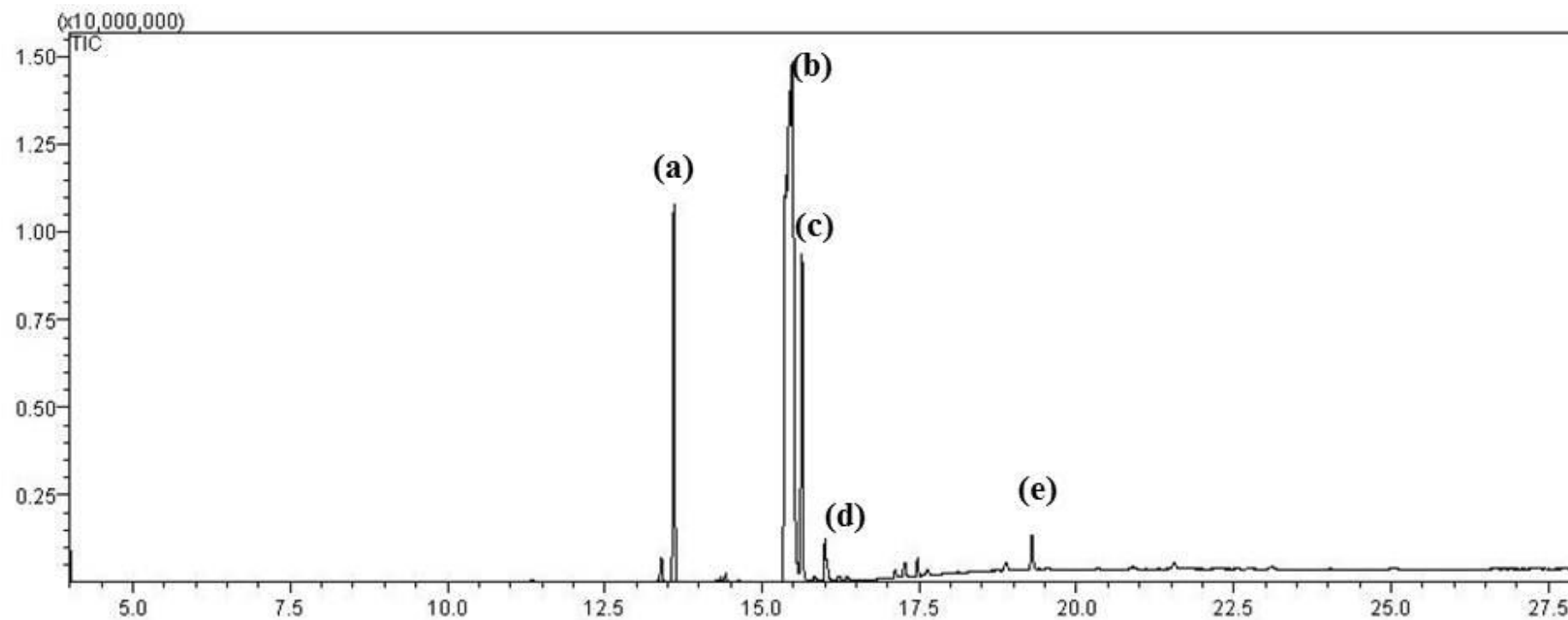
TAN, Y.; LIN, J. Biomass production and fatty acid profile of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10131-10135, 2011.

APÊNDICES

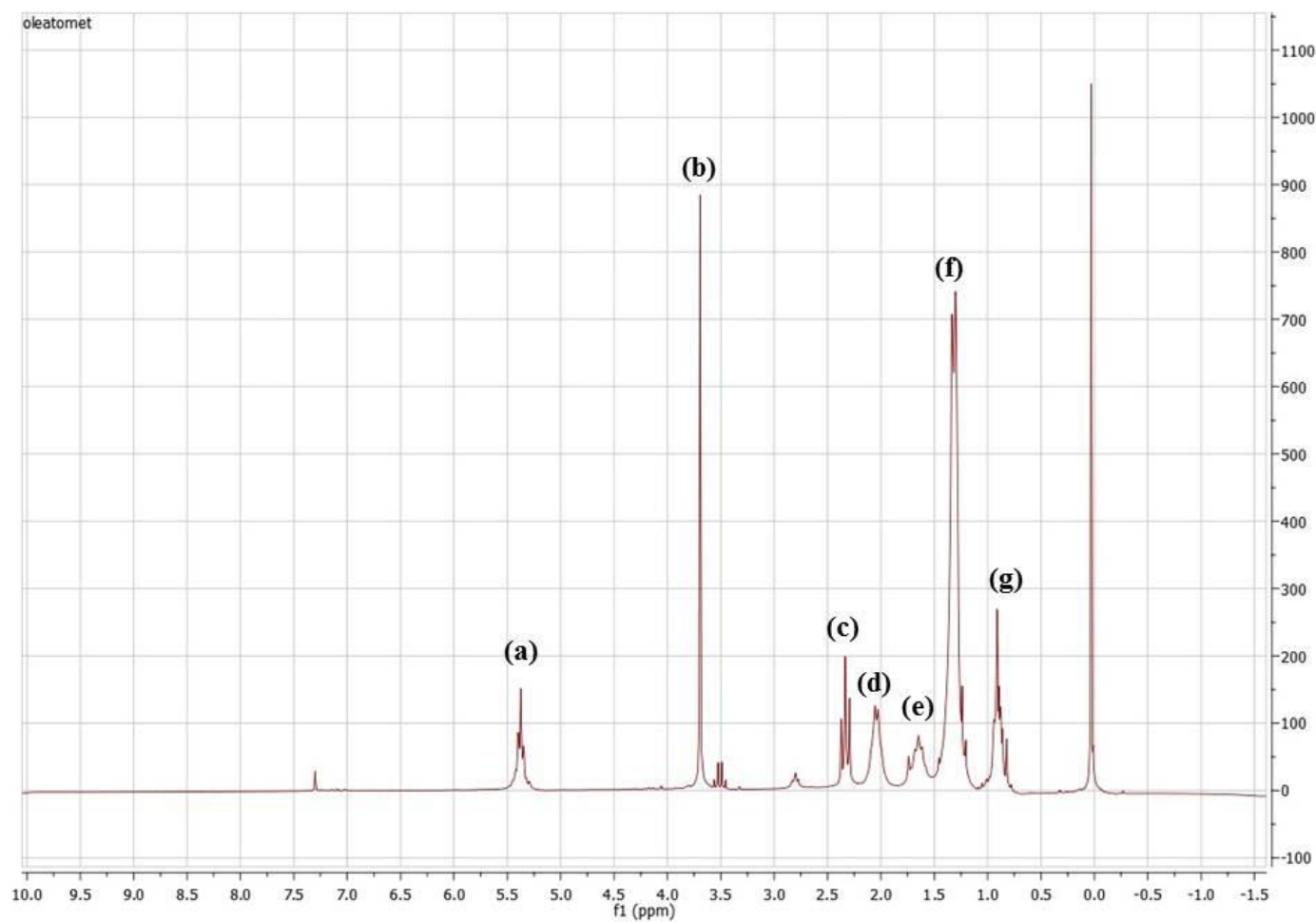
- Apêndice 1.** Cromatograma dos ácidos graxos obtidos da microalga *Scenedesmus* spp. 99
- Apêndice 2.** Cromatograma do oleato de metila obtido da esterificação enzimática do sólido fermentado contendo lipase de *Aspergillus fumigatus*, onde (b) representa o oleato de metila. 100
- Apêndice 3.** Espectro de RMN¹H do oleato de metila obtido da esterificação enzimática do sólido fermentado contendo lipase de *Aspergillus fumigatus*. 101
- Apêndice 4.** Cromatograma do biodiesel de microalgas obtido da esterificação enzimática do sólido fermentado contendo lipase de *Aspergillus fumigatus*. 102
- Apêndice 5.** Espectro de RMN¹H do biodiesel de microalgas obtido da esterificação enzimática do sólido fermentado contendo lipase de *Aspergillus fumigatus*. 103



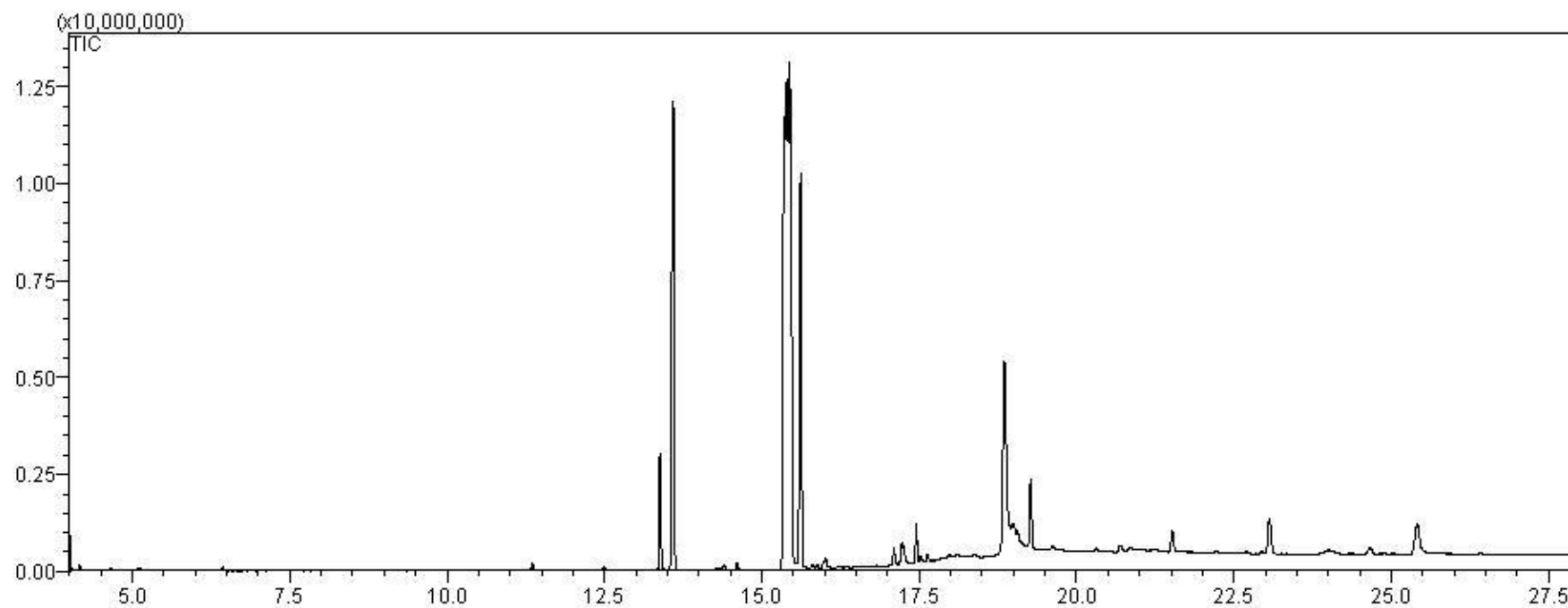
Apêndice 1. Cromatograma dos ácidos graxos obtidos da microalga *Scenedesmus* spp.



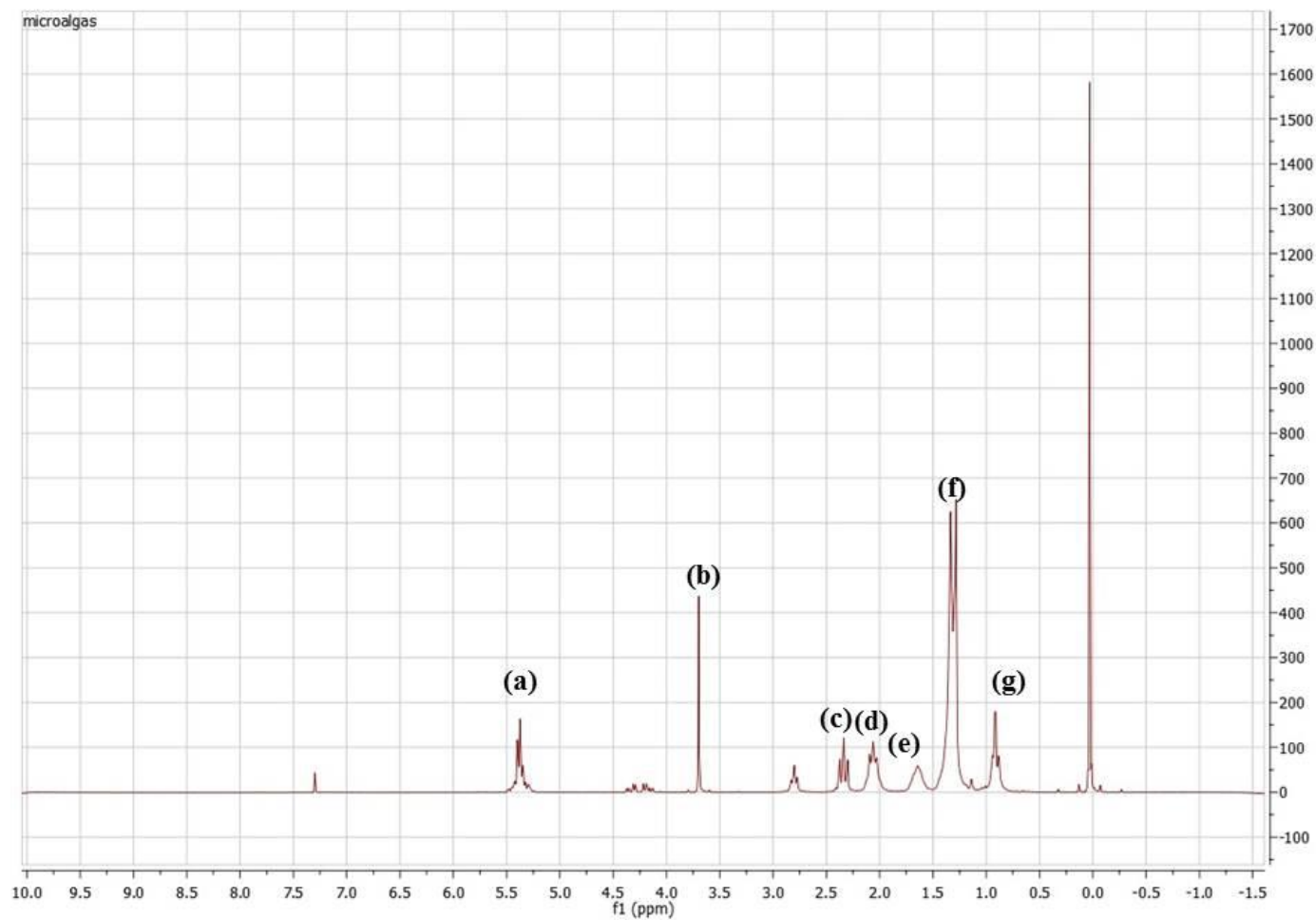
Apêndice 2. Cromatograma do oleato de metila obtido da esterificação enzimática do sólido fermentado contendo lipase de *Aspergillus fumigatus*, onde (b) representa o oleato de metila.



Apêndice 3. Espectro de RMN^1H do oleato de metila obtido da esterificação enzimática do sólido fermentado contendo lipase de *Aspergillus fumigatus*.



Apêndice 4. Cromatograma do biodiesel de microalgas obtido da esterificação enzimática do sólido fermentado contendo lipase de *Aspergillus fumigatus*.



Apêndice 5. Espectro de RMN^1H do biodiesel de microalgas obtido da esterificação enzimática do sólido fermentado contendo lipase de *Aspergillus fumigatus*.

ANEXOS

Anexo 1.	Composição do meio de cultivo Chu	105
Anexo 2.	Composição do meio de cultivo Walne.....	106

Anexo 1. Composição do meio de cultivo Chu.

Solução	Reagente	Fórmula	Quantidade (mg.L⁻¹)
1	Nitrato de sódio	NaNO ₃	25000
2	Cloreto de cálcio di-hidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	2500
3	Sulfato de magnésio hepta-hidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	7500
4	Fosfato de potássio dibásico	K ₂ HPO ₄	7500
5	Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	17500
6	Cloreto de sódio	NaCl	2500
7	Tríplex III/EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ .2H ₂ O	50000
	Hidróxido de potássio	KOH	31000
9	Sulfato ferroso hepta-hidratado	FeSO ₄	4980
	Ácido bórico	H ₃ BO ₃	11420
10	Sulfato de zinco hepta-hidratado	ZnSO ₄ .7H ₂ O	4980
	Cloreto de manganês tetra-hidratado	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,44
	Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄	0,71
	Sulfato de cobre penta-hidratado	CuSO ₄ .5H ₂ O	1,57
	Nitrato de cobalto hexa-hidratado	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,49

Adicionar 10 mL das soluções 1 a 6 e 1 mL das soluções 7 a 10 para cada litro de meio de cultivo.

Anexo 2. Composição do meio de cultivo Walne.

Solução	Reagente	Fórmula	Quantidade (mg.L⁻¹)
1	Nitrato de sódio	NaNO ₃	100000
	EDTA sódico	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ .2H ₂ O	45000
	Ácido bórico	H ₃ BO ₃	33600
	Fosfato de sódio dibásico	Na ₂ HPO ₄	20000
	Cloreto de manganês tetra-hidratado	MnCl ₂ .4H ₂ O	360
	Cloreto de Ferro hexa-hidratado	FeCl ₃ .6H ₂ O	1300
2	Cloreto de zinco	ZnCl ₂	21000
	Cloreto de cálcio	CaCl ₂	20000
	Sulfato de cobre penta-hidratado	CuSO ₄ .5H ₂ O	20000
	Molibdato de amônio tetra-hidratado	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	9000

Adicionar 1 mL da solução 2 a cada litro da solução 1. Para cada litro de meio de cultivo adicionar 1mL da solução 1.